

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**FARMACOLOGIA DA SALIVA DO CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*:  
PAPEL DA MODULAÇÃO DA HEMOSTASIA NA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

**JOSÉ RECK JÚNIOR**

Porto Alegre, outubro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**FARMACOLOGIA DA SALIVA DO CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*:  
PAPEL DA MODULAÇÃO DA HEMOSTASIA NA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

**JOSÉ RECK JÚNIOR**

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

Orientadores: **Prof. Dr. Carlos Termignoni**

**Prof. Dr. Jorge Almeida Guimarães**

Porto Alegre, outubro de 2009

COMISSÃO AVALIADORA DA DISSERTAÇÃO:

---

**Prof. Dr. Carlos Termignoni**

Orientador

Presidente da comissão

---

**Prof. Dr. Jorge Almeida Guimarães**

Co-orientador

---

**Dr. Elói de Souza Garcia**

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, RJ, Brasil

---

**Dr. Ivo Maurício Francischetti**

Vector Biology Section

National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)

Bethesda, MD, EUA

---

**Dr. Rafael Roesler**

Departamento de Farmacologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Porto Alegre, RS, Brasil

---

**Dr. Walter Beys da Silva**

Centro de Biotecnologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Porto Alegre, RS, Brasil

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Bioquímica Farmacológica** do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

*Apoio financeiro:* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Programa Nacional de Excelência (PRONEX), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Entomologia Molecular.

Curso de mestrado realizado com bolsa do CNPq.

O texto desta dissertação está formatado de acordo com as regras do Acordo Ortográfico da Língua

Portuguesa, em vigor desde 1º de janeiro de 2009.

“Além dos laços que se formam entre um pesquisador e seus contemporâneos há os que o ligam àqueles que, antes dele, tiveram igual interesse pela ciência. É como se olhasse para trás e fizesse parte de uma família ligada não pelo sangue, mas pelos liames afetivos do mesmo ideal científico.”

Walter Bradford Cannon (1871-1945)

*traduzido por José Ribeiro do Valle*

“Prognóstico mau para a atividade criadora quando o imediatismo precede o rendimento certo da investigação básica.”

José Ribeiro do Valle (1908 - 2000)

*“Nobel prizes have been awarded to scientists discovering a few pharmacological and physiological mediators. Ticks and insects have been using Nobel prize quality compounds for > 50,000,000 years. We have a lot to learn from them. My respects to these invertebrate pharmacologists!”*

José Marcos Chaves Ribeiro (1995)

Este trabalho é dedicado...

*À Fernanda, pela amizade, companheirismo, amor, e por estar ao meu lado tornando minha vida mais agradável.*

*Aos meus pais, José e Nídia, pelo amor e estímulo para que eu realizasse todos meus objetivos.*

*À Alexandra e a Cássia, pelo incentivo e por terem abdicado de tantas coisas para me ajudar a chegar até aqui.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que conquistei.

Ao meu orientador, professor Carlos Termignoni, pela orientação, oportunidades, incontáveis ensinamentos, conversas agradáveis e enriquecedoras, exemplo de pessoa e de profissional, grande amizade e confiança.

Ao meu “segundo” orientador, professor Jorge Guimarães, pelas oportunidades, incomensuráveis lições (de ciência e vida), amizade e por ser o exemplo de cientista.

Aos meus dois orientadores, por contribuírem para fazer da medicina veterinária uma atividade científica, por representarem com distinção o significado da palavra PROFESSOR, e por terem me mostrado o que é a ciência e o quão gratificante pode ser a atividade científica.

Aos integrantes da comissão avaliadora, doutores Elói Garcia, Ivo Francischetti e Rafael Roesler pelo pronto aceite do convite para comporem a minha banca e pela revisão desta dissertação.

Ao Dr. Walter Beys da Silva, revisor desta dissertação, pelas valiosas sugestões.

Aos integrantes de minha comissão de acompanhamento (CA), professores Guido Lenz (Dep. de Biofísica - UFRGS) e David Driemeier (Dep. de Patologia Clínica Veterinária - UFRGS), pelas sugestões ao longo deste trabalho.

Ao Professor Carlos Alexandre Ferreira, do Instituto de Biociências da PUC-RS, pela amizade, incentivo, idéias, discussões e apoio fundamental na execução de experimentos deste trabalho e nas decisões dos rumos da minha carreira científica.

Ao Dr. João Ricardo Martins, do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), uma grande figura da parasitologia no Brasil, pelas oportunidades, ensinamentos, amizade e pelo apoio incondicional, tendo aberto as portas de seu laboratório para execução de colaborações em diversos projetos.

Ao Professor Itabajara da Silva (Centro de Biotecnologia - UFRGS) e à Professora Fabiana Horn (Dep. Biofísica - UFRGS), pelas sugestões e apoio ao longo deste trabalho.

Ao Professor Cláudio Canal e à Méd. Vet. Fernanda Marks, do Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, pela oportunidade e apoio fundamental na execução de experimentos deste trabalho.

Aos demais professores que de alguma maneira contribuíram para este trabalho ou fizeram diferença na minha formação, seja através da vontade de compartilhar conhecimento como também através do exemplo profissional.

Aos grandes amigos do Laboratório de Bioquímica Farmacológica do Centro de Biotecnologia da UFRGS (em ordem alfabética: Antônio, Markus, Renata e Walter; e aos membros honorários Lucélia e Lucas) pela agradável convivência, amizade, aprendizado e colaborações fundamentais para a execução deste trabalho.

Aos integrantes (colegas e professores) de outros laboratórios do Centro de Biotecnologia, especialmente do Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas, do Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal, e do Laboratório de Proteínas Tóxicas.

Ao Centro de Biotecnologia da UFRGS (professores e alunos), por permitir tantas experiências profissionais e aprendizado, sempre estando de portas abertas à pesquisa científica de qualidade.

À Silvia e ao Luciano, secretários do PPGBCM, pela ajuda e participação fundamental no dia a dia dos alunos do programa.

Ao CNPq e à UFRGS que possibilitaram construir minha carreira profissional com bolsa de estudos, um financiamento público federal essencial para o desenvolvimento da ciência brasileira.

Aos meus pais e irmãs, por tudo o que representam em minha vida, pelo estímulo em buscar meus objetivos, suporte, paciência, carinho, amor incondicional, e por terem feito todos os esforços para permitir e incentivar meu acesso e interesse em sempre estudar.

À Fernanda, pelo exemplo de caráter e profissionalismo, pelo apoio (pessoal e profissional) e força em todas as horas, confiança, pelos momentos divertidos e pelo que aprendi, e especialmente pela amizade, carinho, compreensão e amor.



## ÍNDICE

	Página
<b>LISTA DE ABREVIATURAS &amp; SÍMBOLOS</b> .....	10
<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>PRÓLOGO</b> .....	16
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1. Artrópodos hematófagos: farmacologistas invertebrados?</b> .....	19
<b>1.2. A hemostasia</b> .....	30
<b>1.3. O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i></b> .....	42
1.3.1. <i>Visão geral, biologia, impacto e controle</i> .....	42
1.3.2. <i>Moléculas farmacologicamente ativas da saliva do R. microplus</i> .....	55
1.3.3. <i>Imunoparasitologia: a resistência adquirida</i> .....	57
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	61
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL &amp; RESULTADOS</b> .....	62
<b>3.1. Parte I</b>	
<i>Artigo científico: Systemic alterations of bovine hemostasis due to Rhipicephalus (Boophilus) microplus infestation</i> .....	62
<b>3.2. Parte II</b>	
<i>Artigo científico: Pharmacological action of tick saliva upon haemostasis and the neutralization ability of sera from repeatedly infested hosts</i> .....	70
<b>4. DISCUSSÃO &amp; CONCLUSÕES</b> .....	82
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	86
<b>6. ANEXOS</b> .....	98

## LISTA DE ABREVIATURAS & SÍMBOLOS

ADP	Difosfato de adenosina
a.C.	Antes de Cristo
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (célula apresentadora de antígenos)
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
BK	Bradicinina
BmAP	<i>Boophilus microplus anticoagulant protein</i>
C-terminal	Carbóxi-terminal
d.C.	Depois de Cristo
Da	Daltons
ESTs	<i>Expressed sequence tags</i>
Gla	$\gamma$ -carboxiglutamato
Gly	Glicina
HSPG	Proteoglicanos de heparan sulfato
IL	Interleucina
kDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
KKS	Sistema calicreínas-cininas
L	Litro
Mg	Miligrama
Mm	Milímetro
N	Norte
nM	Nanomolar
P	Página
PA	Ativadores de plasminogênio
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio 1
PAI-2	Inibidor do ativador de plasminogênio 2
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandinas

Phe	Fenilalanina
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipase C
Pro	Prolina
PS	Fosfatidilserina
RIBS	<i>Repeated infested bovine sera</i> (soro de bovinos repetidamente infestados)
RNA	Ácido ribonucléico
S	Sul
SEAPPA	Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio
Ser	Serina
TAFI	Inibidores de fibrinólise ativados por trombina
TF	Fator tissular
TFPI	Inibidor da via do fator tissular
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
tPA	Ativador tissular de plasminogênio
TPB	Tristeza parasitária bovina
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
uPA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase
V	Volume
vWf	Fator de von Willebrand
5-HT	Serotonina
$\mu$ M	Micromolar
%	Percentual
$\approx$	Aproximadamente

## RESUMO

Carrapatos são artrópodos hematófagos distribuídos por todo o mundo e vetores de diversas doenças. Como todos os hematófagos, os carrapatos possuem um arsenal de moléculas que inibe a resposta hemostática do hospedeiro, o que viabiliza o repasto sanguíneo bem-sucedido. O carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um carrapato de um só hospedeiro e considerado o mais importante parasito de animais domésticos da América Latina. O *R. microplus* causa sérios danos aos bovinos, direta, e principalmente, devido à espoliação de sangue que leva à anemia e diminuição da produção de leite e do ganho de peso; e, indiretamente, via a transmissão de patógenos, como *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. O *R. microplus* é também um modelo interessante para o estudo das relações parasito-hospedeiro, visto que ele permanece fixado ao mesmo hospedeiro durante toda a sua vida parasitária, o que leva em torno de três semanas. Os objetivos deste trabalho são explorar os mecanismos farmacológicos da saliva do carrapato *R. microplus* capazes de modular o sistema hemostático, bem como o papel que esta modulação desempenha na relação parasito-hospedeiro. Nesse sentido, este estudo foi organizado em duas partes. Primeiramente, foi realizada uma investigação sobre os parâmetros hemostáticos em bovinos infestados por carrapatos. Em um segundo momento, foram estudados os mecanismos da saliva do carrapato envolvidos na inibição da hemostasia, assim como a habilidade do soro de bovinos repetidamente infestados (que apresentam resistência imunológica naturalmente adquirida contra o carrapato bovino) em interferir na ação anti-hemostática da saliva do carrapato. Na primeira parte do estudo, foi demonstrado que bovinos experimentalmente infestados com 20.000 larvas de *R. microplus* apresentam uma diminuição na capacidade de agregação plaquetária (em resposta a colágeno e ADP), bem

como na coagulação sanguínea (evidenciada por um aumento nos tempos de tromboplastina parcialmente ativado e de protrombina), enquanto a contagem de plaquetas e os níveis de fibrinogênio aumentaram significativamente ao longo da infestação. Na segunda parte, foi demonstrado que a saliva de *R. microplus*: (i) apresenta atividade inibitória *in vitro* sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno; (ii) inibe a indução de ativação endotelial; e (iii) reduz a trombogênese *in vivo*. Ademais, o soro de bovinos repetidamente infestados (RIBS) foi capaz de bloquear parcialmente a atividade anticoagulante e antitrombótica da saliva e totalmente a modulação da ativação endotelial, ao passo que o RIBS não apresentou nenhum efeito sobre a inibição da agregação plaquetária. O conjunto dos dados apresentados permite um melhor entendimento dos fenômenos que ocorrem no hospedeiro durante o parasitismo, e também fornece mais subsídios para uma maior compreensão do processo de hematofagia e dos mecanismos fisiopatológicos que regem a relação parasito-hospedeiro.

## ABSTRACT

Ticks are blood-feeding arthropods widely distributed in the world and vectors of several diseases. Like all hematophagous animals, ticks resort to a variety of molecules in order to avoid the host hemostatic response, which in turn allow a successful blood-meal. The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is an one-host tick, and is considered the most harmful parasite of domesticated animals in Latin America. *R. microplus* causes expressive injuries to bovines, directly, mainly due to blood spoliation, leading to anemia, and diminution of milk production and weight gain. Indirectly the tick is responsible for the transmission of pathogens such as *Babesia* spp. and *Anaplasma* spp. *R. microplus* is also a consistent model to study the parasite-host relationship, since it remains attached to the same host throughout the whole parasitic stage, which lasts around three weeks. This work aims at exploring the pharmacological mechanisms of *R. microplus* tick saliva able to modulate hemostasis, and the role of this modulation in tick-host relationship. In this sense, this study was organized in two parts: firstly, an investigation about the hemostatic parameters in tick infested bovines was performed. Secondly, the tick salivary mechanisms involved in the inhibition of hemostasis were studied, and the ability of serum from repeatedly infested bovines (which displays natural acquired immunological resistance to the cattle tick) to interfere in anti-hemostatic activity of tick saliva was also investigated. In the first part of this study it was shown that calves experimentally infested with 20,000 *R. microplus* larvae display a decrease in platelet aggregation (in response to collagen and ADP) as well as in coagulation ability (evinced by an increase in activated partial thromboplastin time and prothrombin time), whereas platelet blood count and fibrinogen level significantly increased during the course of infestation. In the second part of this

work, it was demonstrated that *R. microplus* saliva: (i) displays *in vitro* inhibitory activity upon collagen-induced platelet aggregation; (ii) inhibits the induction of endothelial activation; and (iii) reduces thrombogenesis *in vivo*. Moreover, repeated infested bovine sera (RIBS) were shown to be able to partially block the delay of coagulation and the anti-thrombotic effect of saliva, and to totally abolish the modulation of endothelium activation, in spite of the fact that RIBS has no effect on the inhibition of platelet aggregation. The set of data presented in this work allows a better understanding of the phenomena occurring in the host during parasitism, and also gives more insights to improve the understanding of the hematophagy process and the pathophysiological mechanisms behind host-tick interaction.

## PRÓLOGO

*“Satânico é meu pensamento a teu respeito, e ardente é o meu desejo de apertar-te em minha mão,  
numa sede de vingança incontestável pelo que me fizeste ontem.*

*A noite era quente e calma e eu estava em minha cama quando, sorrateiramente, te aproximaste.*

*Encostaste o teu corpo sem roupa no meu corpo nu, sem o mínimo pudor.*

*Percebendo minha aparente indiferença, aconchegaste-te a mim e  
mordeste-me sem escrúpulos até nos mais íntimos lugares. Eu adormeci.*

*Hoje, quando acordei, procurei-te numa ânsia ardente, mas em vão.*

*Deixaste em meu corpo e no lençol provas irrefutáveis do que entre nós ocorreu durante a noite.*

*Esta noite recolho-me mais cedo para, na mesma cama, te esperar.*

*Quando chegares, quero te agarrar com avidez e força...*

*Quero te apertar com todas as forças de minhas mãos.*

*Não haverá parte do teu corpo em que meus dedos não passarão.*

*Só descansarei quando vir sair, o sangue quente do teu corpo.*

*Só assim, livrar-me-ei de ti, INSETO f... d... p...!”*

*“Poema sobre uma noite de amor”*

CARLOS DRUMMOND DE ANDRADE

A evidente importância dos artrópodos hematófagos não é somente notada por pesquisadores e profissionais de saúde pública. O escritor Carlos Drummond de Andrade (1902-1987), talvez, o maior poeta brasileiro de todos os tempos, registra com bom humor, na composição *“Poema sobre uma noite de amor”*, suas impressões sobre a capacidade de um desses animais de interferir no dia a dia de qualquer pessoa comum. Provavelmente, semelhante percepção também tenha sido um dos motivos responsáveis pela conhecida



aversão da princesa Carlota Joaquina (1775-1830) em relação ao Brasil, que ela definia, supostamente de maneira pejorativa, como sendo uma terra rica em mosquitos e carrapatos.

Os artrópodos constituem o grupo de animais mais numeroso e adaptado que habita a Terra atualmente. As diferentes espécies de artrópodos podem ser encontradas em todos os climas e distintos nichos ecológicos conhecidos. A capacidade de adaptação e diversidade destes animais é evidenciada pela variedade de artrópodos com estratégias de vida bastante diferentes, como, por exemplo, espécies com complexas redes de interação social, ou animais capazes de produzirem secreções venenosas para alimentação ou defesa, ou, ainda, um grupo altamente especializado em viver no organismo de outros animais, assim, alimentando-se nestes através de um fenômeno denominado parasitismo. Entre os artrópodos parasitos, existe ainda um grupo de animais que desenvolveu como estratégia parasitária o hematofagismo. Esse recurso permite a obtenção de um alimento rico e amplamente encontrado em qualquer ambiente onde haja animais vertebrados.

Os artrópodos hematófagos constituem um grupo bastante heterogêneo, mas, de maneira geral, apresentam grande importância na saúde pública, sendo importantes vetores de doenças humanas e animais. Entre os hematófagos mais estudados e causadores de problemas sanitários, estão: os mosquitos (família *Culicidae*), *Aedes aegypti* (vetor da dengue e da febre amarela), *Anopheles* spp. (vetor da malária); os flebotomíneos (subfamília *Phlebotominae*) como a *Lutzmyia* spp. (vetor da leishmaniose); os barbeiros (família *Reduviidae*), *Triatoma* spp. e *Rhodnius* spp. (vetores da tripanossomíase ou Doença de Chagas); e os carrapatos (ordem *Ixodida*), *Ixodes scapularis* (vetor da Doença de Lyme), *Amblyomma cajennense* (vetor da febre maculosa brasileira), *Rhipicephalus microplus* (vetor do complexo tristeza parasitária bovina), *Ornithodoros coriaceus* (vetor do aborto epizootico bovino), e *Ornithodoros moubata* (vetor da febre recorrente africana

em humanos e da peste suína africana). As doenças citadas são responsáveis por inúmeras mortes de humanos e animais anualmente, sendo responsáveis pelo gasto de milhões de dólares em medidas de controle e prevenção. Este impacto torna-se ainda maior em países em desenvolvimento (América Latina, África e Ásia continental), onde a dificuldade de implantação de programas estratégicos de prevenção, diagnóstico e controle, associada com as condições sanitárias e aspectos climáticos, torna o ambiente ideal para propagação de doenças transmitidas por vetores.

A infestação por parasitos hematófagos, bem como as doenças transmitidas por vetores artrópodos são alguns dos principais problemas de saúde pública a serem enfrentados no século XXI (MOORE, 2008). Para a compreensão e controle dos danos associados com vetores artrópodos é necessário que haja um maior entendimento dos fenômenos relacionados ao ciclo de vida, biologia, flutuação sazonal e epidemiologia, mecanismos moleculares de parasitismo e capacidade de adaptação a habitats e hospedeiros através do desenvolvimento de estudos com equipes e abordagens multidisciplinares (MOORE, 2008). Desse modo, os estudos sobre os artrópodos hematófagos ainda apresentam grandes desafios a serem vencidos pelos pesquisadores.

## 1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodos hematófagos pertencentes à ordem *Ixodida*, e divididos em duas famílias principais, *Ixodidae* (*hard-ticks* ou carrapatos duros) e *Argasidae* (*soft-ticks* ou carrapatos moles), contabilizando um total de mais de 800 espécies (CAMICAS et al., 1998). Os carrapatos e outros artrópodos hematófagos podem parasitar uma grande variedade de hospedeiros vertebrados e para que possam obter acesso à sua fonte de alimento desenvolveram uma série de mecanismos especializados que permitem esse tipo de parasitismo.

### 1.1. Artrópodos hematófagos: farmacologistas invertebrados?

Apesar da grande variedade de artrópodos que podem realizar hematofagismo, visto que existem cerca de 14 mil espécies de artrópodos hematófagos, os desafios a serem vencidos por estes parasitas são fundamentalmente os mesmos (RIBEIRO, 1995). O primeiro ponto consiste em encontrar o hospedeiro no qual irão realizar o repasto sanguíneo. Os mecanismos de procura de hospedeiro são baseados na detecção de estímulos semioquímicos (caimônios), calor corporal do hospedeiro, estímulos visuais e auditivos (SONENSHINE, 2008). Este processo nem sempre é rápido ou simples, por exemplo, devido ao fato de algumas espécies de hematófagos possuírem alta especificidade quanto ao hospedeiro a ser parasitado. Depois de localizado o alvo, os parasitos sobem no hospedeiro e escolhem um local para iniciar a hematofagia. Neste momento, o hematófago deve romper a barreira mecânica da pele e iniciar o processo que visa obter o acesso ao sangue do hospedeiro. Basicamente, para obter o sangue de seus hospedeiros, os artrópodos hematófagos podem canular diretamente um vaso (vênulas e arteríolas) da pele (como os triatomídeos), ou alimentar-se em um “bolsão hemorrágico” (como os carrapatos), que

contém sangue oriundo do rompimento de vasos sanguíneos de pequeno calibre (capilares, ou vênulas e arteríolas) (LAVOPIERRE, 1964; RIBEIRO, 1987).

Os desafios para executar um parasitismo bem-sucedido não se restringem a encontrar um hospedeiro ou mesmo, simplesmente, obter acesso ao sangue. A localização dos vasos sanguíneos e os primeiros instantes após a fixação do parasito representam justamente os momentos mais críticos do processo parasitário, sendo que, neste momento, os artrópodes lançam mão de uma série de recursos para garantir o aporte sanguíneo e manter a alimentação mesmo frente às reações de defesa do hospedeiro. A melhor definição para a importância e complexidade dos processos relacionados à fixação no hospedeiro e manutenção da hematofagia foi estabelecida por RIBEIRO (1995), que, em uma clássica revisão sobre os recursos e mecanismos moleculares da saliva de artrópodos hematófagos, introduziu o conceito de que esses animais seriam “farmacologistas invertebrados”. Esta analogia caracteriza o fenômeno da hematofagia como sendo um delicado processo de modulação farmacológica de diversos sistemas do hospedeiro, e não simplesmente um procedimento mecânico, como uma flebotomia (RIBEIRO, 1995). Os mediadores farmacológicos encontrados na saliva destes parasitos exercem diversas funções para garantir o repasto sanguíneo e inibir as respostas do hospedeiro. O arsenal de moléculas que os diferentes artrópodos hematófagos dispõem apresenta uma grande variedade de princípios ativos e mecanismos de ação devido à convergência evolutiva do processo de hematofagia de artrópodos pertencentes a diversas ordens e famílias (RIBEIRO, 1987). Além disso, várias moléculas de um mesmo organismo apresentam ações redundantes, inibindo, por exemplo, diferentes pontos de uma mesma rota fisiológica. As principais funções farmacológicas que estes componentes salivares devem exercer são: vasodilatação;

inibição da agregação plaquetária; inibição da coagulação; atividades anti-inflamatória e imunossupressora; e modulação endotelial (RIBEIRO, 1987).

Inicialmente, para garantir sua alimentação os hematófagos necessitam de moléculas capazes de aumentar a dilatação dos vasos e, conseqüentemente, o volume de sangue local, assim, permitindo que as peças bucais dos hematófagos possam canular ou romper os vasos da pele e garantir o aporte de sangue com um fluxo adequado. Existem diversas moléculas que podem atuar como vasodilatadores na saliva de animais hematófagos, entre as principais, destacam-se os eicosanoides (em carrapatos), a adenosina (em flebotomídeos), as moléculas carreadoras de óxido nítrico (como as nitroforinas dos triatomídeos), os peptídeos bioativos (em mosquitos e flebotomídeos) e enzimas do tipo peroxidase (em mosquitos) (DICKINSON et al., 1976; RIBEIRO et al., 1990; LERNER et al., 1991; RIBEIRO & NUSSENZVEIG, 1993; CHAMPAGNE & RIBEIRO, 1994; BOWMAN et al., 1996; RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003).

Quando há um rompimento de um vaso ou uma lesão, prontamente, um complexo sistema em cascata, composto por enzimas e outras moléculas, conhecido como hemostasia, é ativado no organismo evitando a perda de sangue. A hemostasia é composta por diversas etapas e mediadores, e seus principais agentes são as proteínas conhecidas como fatores de coagulação, as plaquetas e o endotélio (SIMMONDS & LANE, 1998). O funcionamento detalhado do sistema hemostático é descrito no subitem 1.2, desta dissertação. Pelo fato da hemostasia tratar-se de uma resposta tão eficiente e complexa, a hematofagia é estritamente dependente da modulação (distúrbio) do sistema hemostático, de modo a inibi-lo e garantir a fluidez e o aporte de sangue no local de alimentação do hematófago. É razoável supor que a capacidade de inibir a coagulação seja o requisito fundamental que possibilitou a alguns animais a especialização em adquirir hábitos hematófagos.

As moléculas anti-hemostáticas são os componentes mais bem estudados e caracterizados presentes na saliva dos artrópodos hematófagos (CHAMPAGNE, 2004). Este grupo de moléculas é dividido principalmente em antiplaquetários ou inibidores de agregação plaquetária e em moléculas anticoagulantes ou inibidores de coagulação. Os antiplaquetários podem exercer sua função por diferentes mecanismos de ação, como, por exemplo, através da hidrólise de agonistas plaquetários (realizada pela apirase e outras nucleotidases), sequestro de agonistas plaquetários (como mediado por algumas lipocalinas); antagonismo de receptores plaquetários, ou inibição das vias de sinalização de ativação plaquetária (via ação da adenosina e prostaciclina) (RIBEIRO et al., 1984; 1988; 1991; RIBEIRO & MODI, 2001; FRANCISCHETTI et al., 2000; MANS et al., 2002). Os anticoagulantes encontrados nos hematófagos são moléculas capazes de interagir com proteínas da cascata de coagulação, inativando-as. O representante mais conhecido deste grupo de moléculas é a hirudina, que é um peptídeo inibidor de trombina, isolado da sanguessuga *Hirudo medicinalis*, sendo uma das primeiras moléculas naturais de origem animal a ser testada como fármaco antitrombótico (MARKWARDT, 1994).

Particularmente, entre os carrapatos, existe uma grande variedade de anti-hemostáticos já descritos. A presença de atividade do tipo apirase, que é capaz de inibir a agregação plaquetária através da degradação do agonista ADP, já foi identificada na saliva dos carrapatos *Ixodes scapularis* (RIBEIRO et al., 1985), *Ornithodoros moubata* (RIBEIRO et al., 1991) e *O. savignyi* (MANS et al., 2000). Outras moléculas presentes na saliva de carrapatos também são capazes de interferir com o processo de agregação plaquetária. O carrapato *O. moubata* produz uma proteína denominada moubatina, que liga tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), um agonista plaquetário (KELLER et al., 1993; MANS et al., 2003). A moubatina pertence à classe das proteínas conhecidas como lipocalinas, que

formam uma espécie de barril de folhas  $\beta$ , as quais ligam, em seu interior, pequenas moléculas hidrofóbicas (KELLER et al., 1993; MANS et al., 2003). Alguns carrapatos também utilizam um mecanismo de inibição plaquetária bastante refinado, que consiste na secreção salivar de antagonistas de receptores de fibrinogênio na superfície da plaqueta, a glicoproteína do tipo integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Estes antagonistas de receptores do tipo integrina são comumente designados como desintegrinas. Em carrapatos, o exemplo clássico de desintegrina é a savignygrina, produzida pelo carrapato *O. savignyi*. Esta proteína, com cerca de 7 kDa, possui o motivo padrão de desintegrinas (RGD, Arg-Gly-Asp), que permite sua interação com a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e inibição da ligação da plaqueta ao fibrinogênio, inibindo assim a agregação plaquetária (MANS et al., 2002). Outros tipos de moléculas variantes das desintegrinas clássicas são descritas nos carrapatos *O. moubata* e *Dermacentor variabilis*, como a disagregina e a variabilina, respectivamente (KARCZEWSKI et al., 1994; WANG et al., 1996). Além dos inibidores específicos de agregação plaquetária, os inibidores de trombina também são capazes de bloquear o processo de agregação plaquetária (ANDERSON & VALENZUELA, 2008).

De maneira geral, os anticoagulantes de carrapatos e de outros animais hematófagos agem, principalmente, inibindo moléculas de trombina ou de fator Xa. Contudo, a inibição da coagulação por esses inibidores não ocorre somente via inativação isolada dessas enzimas, mas também via interação com arranjos multimoleculares pró-coagulantes, como os complexos iniciador da via do fator tissular, tenase e protrombinase (MANS & NEITZ, 2004; FRANCISCHETTI et al., 2009). Anticoagulantes que agem via inibição de trombina já foram descritos na grande maioria dos artrópodos hematófagos já estudados. Em carrapatos, alguns exemplos de inibidores de trombina são a americanina de *Amblyomma*

*americanum* (ZHU et al., 1997), a madanina de *Haemaphysalis longicornis* (IWANAGA et al., 2003), a savignyina de *O. savignyi* (NIENABER et al., 1999), a calcaratina de *Rhipicephalus (Boophilus) calcaratus* (MOTOYASHIKI et al., 2003), e o BmAP e a microfilina de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (HORN et al., 2000; CIPRANDI et al., 2006). Os inibidores de coagulação encontrados em carrapatos e outros animais hematófagos podem diferir de tamanho e de mecanismo de ação, variando desde pequenos peptídeos a moléculas maiores, como as pertencentes ao grupo das serpinas (inibidores de serinoproteases) ou mesmo os inibidores do tipo Kunitz (MANS & NEITZ, 2004). Os inibidores do tipo Kunitz são bastante versáteis e podem possuir um ou mais domínios que se caracterizam por dobramentos contendo entre 51-64 resíduos de aminoácidos (contendo 6 cisteínas), que formam uma folha beta central antiparalela com uma curta hélice C-terminal e que interagem com diferentes serinoproteases, levando à inibição da atividade enzimática (PETERSEN et al., 1996). Entre estes inibidores, destacam-se o ixolaris e o penthalaris, isolados do carrapato *I. scapularis*, que apresentam respectivamente, dois e cinco domínios do tipo Kunitz e alta homologia com uma molécula endógena do sistema hemostático dos vertebrados, o inibidor da via do fator tissular (TFPI) (FRANCISCHETTI et al., 2002; FRANCISCHETTI et al., 2004). O ixolaris apresenta efeito antitrombótico *in vivo* (NAZARETH et al., 2006), e seu mecanismo de ação é via ligação ao fator X e Xa, inibindo o complexo iniciador da via do fator tissular (fator tissular e fator VIIa) e o complexo protrombinase (fator Va e Xa) (FRANCISCHETTI et al., 2002). Além da inibição da ativação da hemostasia, outro recurso anti-hemostático interessante para os artrópodos hematófagos parece ser a ação fibrinolítica de sua saliva (o funcionamento do sistema fibrinolítico é descrito juntamente com o sistema hemostático no subitem 1.2, desta



dissertação). Contudo, até o momento, a atividade fibrinolítica só está bem caracterizada para o carrapato *I. scapularis* (FRANCISCHETTI et al., 2003).

Além de inibir as respostas de vasoconstrição e a hemostasia, que são desencadeadas em decorrência do ferimento feito pelas suas peças bucais, os hematófagos necessitam, também, modular a inflamação, uma resposta inata e rápida a qualquer agressão ao organismo. Imediatamente após o dano tecidual decorrente da introdução das peças bucais e do rompimento dos vasos sanguíneos, são produzidos e liberados componentes que exercem o recrutamento de mediadores inflamatórios humorais e celulares. A inflamação é classicamente caracterizada pelos fenômenos de dor, eritema, edema e calor (LEWIS, 1971). Os eventos de eritema, edema e calor são decorrentes de um aumento do fluxo sanguíneo local, do aumento da permeabilidade capilar, do extravasamento celular e da infiltração de polimorfonucleares (MERCHANT & TABOADA, 1991). É importante ressaltar que a resposta inflamatória local, particularmente a ocorrência de dor e prurido, é a principal responsável por movimentos de rejeição ao parasito por parte do hospedeiro, através de estímulos de procura e remoção mecânica do agressor.

A lesão vascular leva à exposição de constituintes de tecidos adjacentes, bem como de fragmentos celulares, que, por sua vez, ativam uma série de reações inflamatórias. A interação dos componentes do sangue com a superfície negativa da membrana basal, associada à exposição de outras biomoléculas negativamente carregadas, oriundas de lesão celular, como os ácidos nucleicos, e o desencadeamento das respostas hemostáticas levam à ativação do sistema contato ou sistema calicreínas-cininas (KKS). O mecanismo básico de funcionamento do KKS consiste na ativação da pré-calicreína, que age sobre moléculas de um precursor (cininogênio), assim, gerando peptídeos genericamente conhecidos como

cininas, sendo a bradicinina (BK, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) a mais conhecida. A BK é o mais potente mediador algésico conhecido e, além de nocicepção, também induz vasodilatação periférica, aumento do fluxo sanguíneo, extravasamento vascular, quimiotaxia e ativação de mastócitos e macrófagos, contração da musculatura lisa visceral, liberação de autacoides e eicosanoides (BHOOLA et al., 1992). Produzidos em decorrência de lesão celular, os eicosanoides são oriundos de uma série de reações de enzimas do grupo das fosfolipases sobre fosfolipídeos de membrana, que dão origem ao ácido aracônico, que, por sua vez, é processado em eicosanoides via ação das ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases. Os principais eicosanoides conhecidos são as prostaglandinas, que são mediadores clássicos da inflamação, envolvidos nos principais fenômenos inflamatórios locais e sistêmicos. Apesar das prostaglandinas, *per si*, não causarem dor, são capazes de baixar o limiar nociceptivo das fibras aferentes do tipo C, favorecendo a percepção dolorosa frente a outros estímulos (MATSUOKA & NARUMIYA, 2008).

A lesão tecidual também desencadeia a ativação do sistema complemento, que também é um sistema em cascata, que realiza a opsonização de antígenos e lise de células estranhas ao organismo. É importante ressaltar que, frente a uma lesão tecidual, existe uma série de interações entre diferentes sistemas de defesa que amplificam o sinal inflamatório. Desse modo, as ativações dos sistemas hemostático, contato e complemento estão intimamente ligadas, bem como com os fenômenos de migração/infiltração celular e de apresentação de antígenos e montagem da resposta imune adaptativa (GUIMARÃES, 1981).

Além dos efeitos diretos dos mediadores inflamatórios discutidos, estes componentes ainda exercem um potente efeito quimiotático, atraindo para o local da lesão

células inflamatórias. Em um primeiro momento, as células que chegam à lesão são principalmente neutrófilos, células teciduais apresentadoras de antígenos (APC, como células dendríticas e de Langerhans) e células inflamatórias (basófilos e mastócitos). As APC e os neutrófilos iniciam a fagocitose e o desencadeamento da resposta imune adaptativa, que terá vital importância nos casos de parasitismo de longa duração, como ocorre nos carrapatos. As células inflamatórias e os neutrófilos iniciam a produção de citocinas quimiotáticas e liberam diversos mediadores que interferem na manutenção do parasitismo (WIKEL, 1996b). Entre os mediadores liberados, encontram-se a serotonina (5-HT) e a histamina, que acentuam as condições pró-inflamatórias no sítio de fixação do parasito. A 5-HT pode ainda ser responsável por mediar nocicepção e prurido (SOMMER, 2006). A histamina, além dos efeitos inflamatórios clássicos, parece ainda desempenhar um efeito nocivo direto sobre a fixação das larvas de carrapatos e estar intimamente relacionada à resistência adquirida ao carrapato após sucessivas infestações (TATCHELL & BENNETT, 1969; KEMP & BOURNE, 1980; WIKEL, 1982).

Um exemplo notável de adaptação dos hematófagos ao parasitismo, é sua capacidade de inibir/bloquear a resposta inflamatória decorrente do parasitismo, o que, de fato, consiste em uma grande vantagem evolutiva que facilitou o processo de hematofagia. Nesse sentido, os artrópodos hematófagos apresentam diversos mecanismos anti-inflamatórios, como, por exemplo, enzimas capazes de hidrolisar BK (cininases) (RIBEIRO & MATHER, 1998; BASTIANI et al., 2002); proteínas que ligam/sequestram aminas biogênicas (histamina e serotonina) (SANGAMNATDEJ et al., 2002; MANS et al., 2008); inibidores do sistema complemento (RIBEIRO & SPIELMAN, 1986; VALENZUELA et al., 2000; MANS & RIBEIRO, 2008); inibidores de proteases envolvidas na resposta inflamatória (KOTSYFAKIS et al., 2006; PREVOT et al., 2009); e compostos que ligam

moléculas quimiotáticas (DÉRUAZ et al., 2008). Ademais, na saliva de alguns artrópodos hematófagos, particularmente nos carrapatos, são encontradas moléculas capazes de modular a resposta imune adaptativa através da supressão da ativação leucocitária e da inibição da expansão clonal linfocítica e da alteração na expressão, liberação e ação de citocinas (BROSSARD & WIKEL, 2008; ANDERSON & VALENZUELA, 2008). A modulação da resposta imune adaptativa pela saliva parece ter particular importância nos carrapatos, visto que representa um ponto crítico nesse parasitismo, pois, ao contrário de outros artrópodos hematófagos que realizam sua refeição durante alguns minutos (como barbeiros e mosquitos), estes parasitos ficam, por vezes, semanas alimentando-se do sangue de um mesmo hospedeiro. As características da resposta imune adquirida do bovino em resposta ao parasitismo do carrapato serão discutidas posteriormente (subitem 1.3.4. desta dissertação).

A importância do endotélio vascular como participante ativo nos distúrbios inflamatórios e infecciosos vem sendo cada vez mais reconhecida, contrapondo-se ao conceito inicial de que as células endoteliais funcionariam como uma simples barreira mecânica inerte entre o sangue e os tecidos (BEHLING-KELLY & CZUPRYNSKI, 2007). Desse modo, além do estudo dos sistemas e mediadores discutidos anteriormente, que estão envolvidos na resposta de defesa do organismo à agressão, a participação do endotélio na relação hematófago-hospedeiro começou a ser investigada com mais detalhes. Nesse sentido, dois trabalhos pioneiros demonstraram a habilidade de secreções de carrapatos em modular as propriedades das células endoteliais. MAXWELL e colaboradores (2005) demonstraram que o extrato de glândulas salivares de *D. andersoni* e de *I. scapularis* reduz a expressão de adesinas e selectinas na superfície de células endoteliais, proteínas essenciais nos processos de recrutamento e infiltração de células inflamatórias.

FRANCISCHETTI e colaboradores (2005a) observaram que a saliva do carrapato *I. scapularis* apresenta atividade anti-angiogênica, introduzindo o conceito de que a saliva modula negativamente a cicatrização e o reparo tecidual, favorecendo o parasitismo hematófago de longa duração, como ocorre em alguns carrapatos.

Além de todas as atividades discutidas anteriormente, identificadas e descritas na saliva e glândulas salivares de artrópodos hematófagos, é importante destacar que abordagens de transcriptômica e proteômica, cada vez mais, têm fornecido informações valiosas e em grandes quantidades sobre a composição da saliva destes animais (RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003). As informações obtidas por essas abordagens permitem um maior entendimento da evolução das famílias de proteínas destes parasitos (MANS & NEITZ, 2004) e otimizam os estudos de função fisiológica (MANS et al., 2003; 2008) e de seu potencial biotecnológico (NAZARETH et al., 2006). Alguns exemplos de parasitos que tiveram a composição molecular de sua saliva/glândula salivar detalhadas por estas metodologias incluem os carrapatos *Ornithodoros coriaceus* (FRANCISCHETTI et al., 2008b), *Ornithodoros parkeri* (FRANCISCHETTI et al., 2008a), *Ixodes pacificus* (FRANCISCHETTI et al., 2005b) e *I. scapularis* (RIBEIRO et al., 2006), a mosca hematófaga *Stomoxys calcitrans* (WANG et al., 2009), o barbeiro *Triatoma infestans* (ASSUMPÇÃO et al., 2007), a pulga *Xenopsylla cheopis* (ANDERSEN et al., 2007), e os mosquitos *Anopheles gambiae* (ARCÀ et al., 2005) e *Aedes albopictus* (ARCÀ et al., 2007). Os dados gerados por estes trabalhos têm contribuído imensamente na compreensão da função da saliva no parasitismo.

Os diversos desafios a serem enfrentados pelos artrópodos hematófagos à obtenção de alimento evidenciam a necessidade destes animais possuírem um vasto arsenal de moléculas farmacologicamente ativas. Dessa maneira, na interface parasito-hospedeiro,

ocorre um embate dependente de um fino balanço entre a ação da saliva do hematófago e as defesas do hospedeiro, sendo a hemostasia provavelmente um dos obstáculos mais importantes a serem vencidos. Isso posto, é evidente o motivo pelo qual estes animais foram denominados “farmacologistas invertebrados”.

## **1.2. A hemostasia**

A hemostasia compreende o conjunto das reações que mantém a fluidez sanguínea em estado fisiológico e evita a perda de sangue em lesões e condições patológicas, mantendo-se, desse modo, como o ponto central de equilíbrio entre a hemorragia e a trombose. Quando há um rompimento em um vaso sanguíneo, a hemostasia prontamente entra em ação e, através da formação de um trombo no local, oclui a lesão e impede o extravasamento do sangue. O sistema hemostático é composto de diversos mediadores e tipos celulares e interage ativamente com outros fenômenos do nosso organismo, como a inflamação, a proliferação celular, a cicatrização tecidual, o sistema contato, o sistema imunológico e o sistema complemento. A ação do sistema hemostático é finamente regulada em várias etapas e através de distintos mecanismos, sendo seu funcionamento dependente de um delicado equilíbrio entre os processos de coagulação, anticoagulação, fibrinólise e da interação do endotélio com os componentes sanguíneos (GUIMARÃES, 1981; JENNY & MANN, 1998; FURIE & FURIE, 2008).

Os principais mediadores do sistema hemostático são as plaquetas e o endotélio (componentes celulares) e os fatores de coagulação (componentes proteicos). Além disso, outros componentes também são essenciais para o adequado funcionamento da hemostasia, como os fosfolípidos e o cálcio. A maioria dos fatores da coagulação são enzimas pertencentes ao grupo das serinoproteases que são sintetizadas principalmente no fígado e

circulam no sangue sob a forma inativa de zimogênios (JENNY & MANN, 1998). A hemostasia é um sistema enzimático de ativação em cascata, de modo que, quando a formação do trombo é necessária, os fatores de coagulação são sequencialmente convertidos enzimaticamente na sua forma ativa através da ação de outras enzimas previamente ativadas, sendo todo este processo desencadeado por um estímulo inicial. Este sinal iniciador é uma característica dos mecanismos de ativação em cascata e é o que permite ao organismo promover complexas reações em série, que culminam com a formação de grandes quantidades do componente efetor final e do produto do processo. No caso da hemostasia, o estímulo iniciador principal é o fator tissular (TF) a partir da formação do complexo iniciador da via do fator tissular (TF associado ao fator VIIa). Fisiologicamente, o TF não é encontrado na circulação, mas a concentração média do fator VII no sangue é de 0,5 mg/L (SILVA & HASHIMOTO, 2006). Já a protrombina (que dará origem ao componente efetor final, a trombina) e o fibrinogênio (que dará origem ao produto final do processo de coagulação, a fibrina) são encontrados na circulação em uma concentração média de 150 mg/L e 3000 mg/L, respectivamente (SILVA & HASHIMOTO, 2006). Esses números demonstram bem a capacidade de amplificação que os sistemas em cascata desempenham, ou seja, a partir de um ínfimo estímulo, ocorre a ativação maciça de diversos mediadores que culminam em uma resposta efetiva em larga escala. Ademais, o mecanismo de circulação sob a forma enzimaticamente inativa, como ocorre com alguns fatores da coagulação, favorece que as moléculas sejam ativadas preferencialmente quando e onde realmente são necessárias, evitando ações indesejadas e disseminadas.

A descrição do funcionamento do sistema hemostático tem sido motivo de algumas divergências ao longo dos últimos anos. Geralmente, para fins didáticos, o sistema hemostático é dividido em três partes, vasoconstrição, agregação plaquetária e a coagulação

propriamente dita. A hemostasia também pode ser separada em primária (compreendendo os eventos de vasoconstrição e agregação plaquetária) e secundária (coagulação e formação do trombo). Assim, para descrever a hemostasia, frequentemente, são explicados, primeiramente, os eventos de agregação e, após, a formação do coágulo, baseando-se no sistema em cascata proposto por MacFARLANE (1964). Foi este sistema que, utilizando evidências de dados obtidos *in vitro*, forneceu inicialmente as bases bioquímicas para o entendimento da formação do coágulo através da ativação sequencial dos fatores da coagulação, o que, por sua vez, poderia ocorrer por duas vias distintas, a extrínseca e a intrínseca.

Contudo, o funcionamento da hemostasia tem sido objeto de discussões com intuito de complementar o modelo inicial de MacFarlane, fornecendo uma abordagem mais fisiológica e celular, visto que a ativação do sistema hemostático e a formação do trombo são processos dinâmicos, em que diversos eventos ocorrem simultaneamente e interagem entre si (HOFFMAN & MONROE, 2001; BLAT & SEIFFERT, 2008; FURIE & FURIE, 2008). Sob tal perspectiva, nesta dissertação, a descrição do sistema hemostático será realizada buscando abranger os eventos de uma maneira global e destacando sua importância fisiológica. Ademais, o modelo escolhido para ser descrito neste trabalho (**Figura 1**) é resultado de uma livre associação entre os modelos de coagulação baseados em células (HOFFMAN & MONROE, 2001), e o que propõe a reintrodução dos componentes do sistema contato em um modelo de hemostasia celular (BLAT & SEIFFERT, 2008).



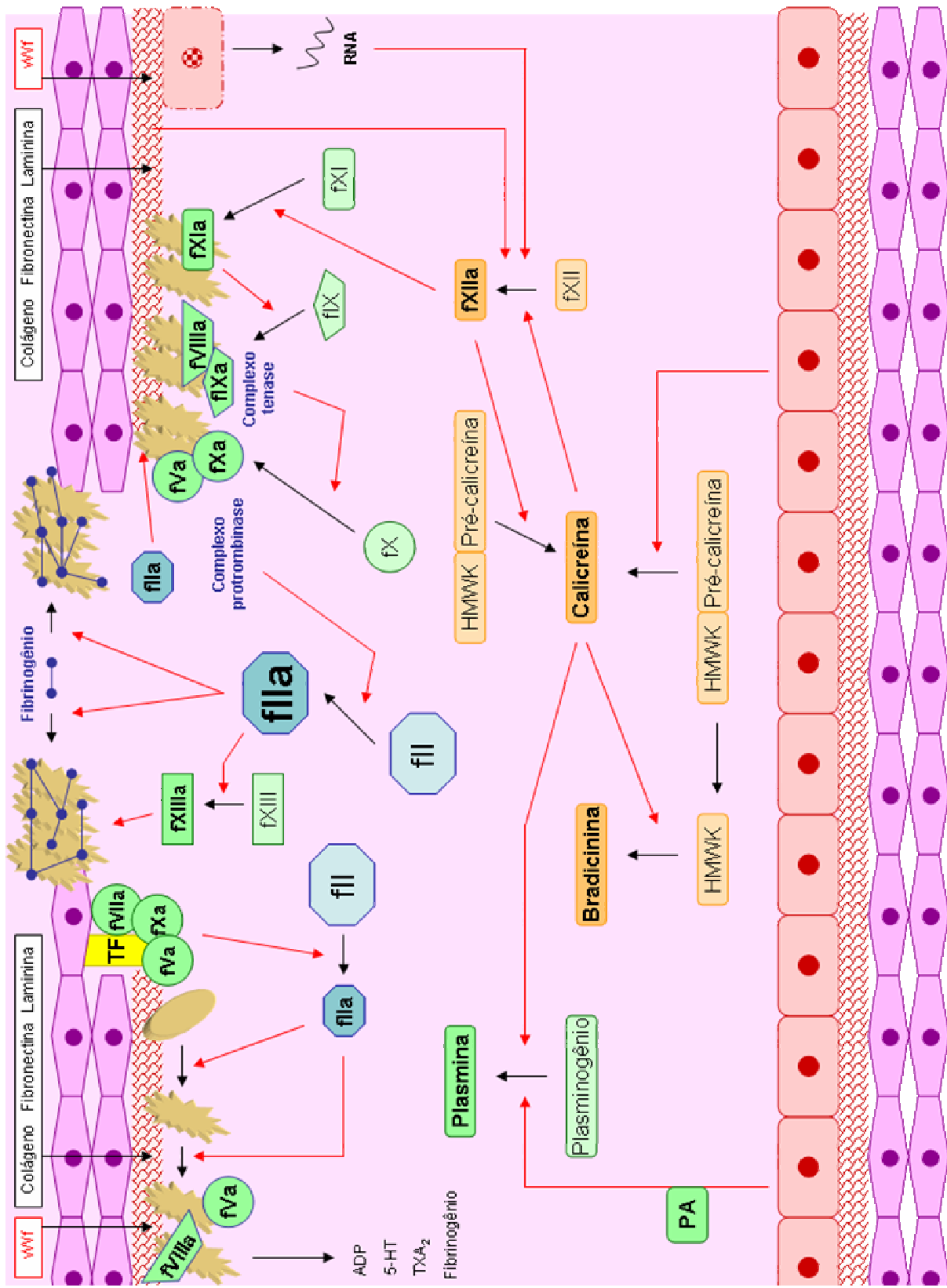


Figura 1 – Desenho esquemático da ativação do sistema hemostático. Elaborado por José Reck Jr (2009)

A ativação da hemostasia ocorre quando há uma lesão vascular e, desse modo, rompimento da continuidade do endotélio, havendo extravasamento dos constituintes sanguíneos e contato com o subendotélio, a membrana basal e o tecido conjuntivo. A alteração no fluxo sanguíneo normal na região lesionada gera, em um primeiro momento, uma ação nervosa reflexa de vasoconstrição transiente em resposta à diminuição dos níveis de oxigenação (MAKRIDES & RYAN, 1998).

Nos tecidos que circundam os vasos, a matriz extracelular e tipos celulares são ricos em proteínas como TF, colágeno, laminina, fibronectina, entre outras. Após o contato destas moléculas com os componentes do sangue, ocorre a ativação da hemostasia que se sucede nas fases sequenciais de iniciação, amplificação e propagação (HOFFMAN & MONROE, 2001).

A exposição de TF leva à interação deste com o fator VII. Esta interação, promove a auto-ativação do VII em VIIa e forma o complexo iniciador da via do fator tissular, cuja atividade catalítica do VIIa é responsável pela conversão, em pequena escala, do zimogênio do fator X em sua forma ativa Xa. A formação de Xa, por sua vez, leva à conversão do fator V em Va, formando o complexo Xa/Va, que induz a formação de pequenas quantidades de trombina a partir da protrombina. Estes fenômenos compreenderiam a fase conhecida como iniciação (HOFFMAN & MONROE, 2001).

A exposição do tecido extravascular leva também à interação das plaquetas com componentes da matriz extracelular. Esta interação inicia o processo de adesão plaquetária, onde diferentes receptores plaquetários, do tipo integrinas, promovem a ligação das plaquetas a proteínas da matriz, como o colágeno. Esta interação parece ser, em grande parte, dependente da participação do fator de von Willebrand (vWf), que interage com os componentes do subendotélio e com integrinas (complexo Ib-V-IX) da superfície

plaquetária, com isso, promovendo a aderência ao local lesionado. A trombina gerada na fase de iniciação, apesar de ter sido formada em pequenas quantidades, é capaz de amplificar o estímulo pró-coagulante através da ativação das plaquetas aderidas no subendotélio. De fato, além da trombina, o colágeno também é capaz de iniciar o processo de ativação plaquetária. Neste momento, o processo de hemostasia, visando à formação de trombina e conseqüentemente do trombo, passa a ocorrer na superfície da plaqueta ativada. O processo de ativação plaquetária envolve uma mudança fenotípica, onde a plaqueta: (i) altera sua forma discoide característica para um aspecto globuloso rico em pseudópodos; (ii) expõe na superfície novos receptores do tipo integrina, como o receptor de fibrinogênio  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ; (iii) torna-se uma superfície favorável à formação dos complexos pró-coagulantes, através da exposição de fosfatidilserina (PS); e (iv) acumula na membrana plasmática os fatores V, VIII e XI da cascata de coagulação. A participação essencial dos fosfolípidos de PS no correto funcionamento do sistema hemostático revela também o papel essencial de outros mediadores e vias bioquímicas. A exposição de PS nas plaquetas e outros tipos celulares ativados (células endoteliais e monócitos) permitem a ligação de resíduos de  $\gamma$ -carboxiglutamato (Gla), presentes em alguns fatores de coagulação (como o V e o X), à membrana plasmática, ancorando os complexos pró-coagulantes nas superfícies celulares. Esta ligação é estritamente dependente de cálcio para mediar a ligação Gla-PS, e indiretamente de vitamina K, que é o cofator essencial na conversão enzimática de resíduos de glutamato em Gla, durante a síntese dos fatores de coagulação (KROLL & SULLIVAN, 1998; MAKRIDES & RYAN, 1998; SAVAGE et al., 2001; RUGGERI & MENDOLICCHIO, 2007).

A ativação das plaquetas ainda é acompanhada da secreção do conteúdo dos grânulos plaquetários, que contêm mediadores responsáveis pela ativação e indução de agregação em novas plaquetas, realizando uma retroalimentação positiva no sistema de formação do tampão plaquetário. As principais moléculas secretadas pelos grânulos plaquetários são difosfato de adenosina (ADP), ácido aracdônico, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), trombina, fator V, fibrinogênio e serotonina (5-HT). Alguns dos mediadores liberados pela ativação plaquetária, como TXA<sub>2</sub>, 5-HT e PDGF, são capazes de induzir vasoconstrição. A proteína endotelina, um potente vasoconstritor produzido pelas células endoteliais após alterações decorrentes da ativação do sistema hemostático, particularmente da interação com a trombina e com as plaquetas ativadas, também, auxilia na diminuição do fluxo sanguíneo no local da lesão (KROLL & SULLIVAN, 1998; MAKRIDES & RYAN, 1998; SAVAGE et al., 2001; RUGGERI & MENDOLICCHIO, 2007).

Os fenômenos de adesão, ativação e secreção dos grânulos das plaquetas são seguidos do processo de agregação plaquetária. Este fenômeno é induzido por agonistas plaquetários, cujos principais são a trombina, o colágeno e o ADP. Estes agonistas atuam sobre receptores específicos que, por sua vez, agem via proteína G, ativação de proteína tirosina-quinase e influxo de cálcio. Estes sinais são acompanhados de ativação de fosfolipase C (PLC) e A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que levam à liberação de ácido aracdônico, que é posteriormente metabolizado em TXA<sub>2</sub>, ambos também agentes indutores de agregação plaquetária. A agregação plaquetária é o processo pelo qual as plaquetas unem-se para formar o tampão plaquetário, que obstrui o extravasamento de sangue. O agregado de plaquetas é formado por ligações plaqueta-plaqueta, utilizando o fibrinogênio como ponte. O fibrinogênio liga-se às plaquetas ativadas por meio do receptor do tipo integrina alfa<sub>IIb</sub>beta<sub>3</sub> (KROLL &

SULLIVAN, 1998; SAVAGE et al., 2001; RUGGERI & MENDOLICCHIO, 2007). A trombina gerada na fase de iniciação ainda promove a conversão enzimática dos fatores V em Va, e a clivagem do complexo vWF/fator VIII, dando origem a VIIIa e vWF livres. Estes acontecimentos, em adição aos fenômenos de ativação plaquetária e o início da agregação, associados ao assentamento dos fatores Va e VIIIa na superfície da plaqueta constituem a fase de amplificação da hemostasia (HOFFMAN & MONROE, 2001). Simultaneamente a esses acontecimentos, a exposição de componentes de carga fortemente negativa, como proteínas do subendotélio e de ácidos nucleicos (RNA) oriundos de lesão celular, promovem uma pequena autoativação do fator XII em XIIa através de alterações conformacionais em decorrência da interação com esses compostos negativos. A formação de XIIa resulta na conversão de pré-caliceína em caliceína, que realiza uma retroalimentação positiva no eixo, por converter mais XII em XIIa e, conseqüentemente, ativa o sistema contato. O fator XIIa é responsável pela ativação enzimática do fator XI em XIa, que também assenta na superfície das plaquetas ativadas (BLAT & SEIFFERT, 2008).

A fase de propagação é caracterizada pela formação dos complexos pró-coagulantes sobre as plaquetas, pela geração de trombina em larga escala e pela ativação/agregação plaquetária massiva no local da lesão. Na superfície das plaquetas, o fator XIa promove a conversão do IX em IXa. Este último em associação com o VIIIa, forma o complexo tenase (VIIIa/IXa), responsável pela geração de quantidades expressivas de fator Xa. O fator Xa formado associa-se com o fator Va, dando origem ao complexo protrombinase (Va/Xa), que responde pela conversão de grandes quantidades de protrombina em trombina (HOFFMAN & MONROE, 2001; MANN et al., 2003). O funcionamento dos complexos tenase e protrombinase é estritamente dependente de fosfolipídeos e cálcio, e a eficiência catalítica de ambos os complexos, quando associados aos fosfolipídeos da membrana, é

milhares de vezes maior do que a eficiência catalítica dos fatores IXa e Xa, respectivamente, quando em solução. A trombina gerada em grande quantidade converte cataliticamente fibrinogênio em fibrina. A estabilização do polímero de fibrina é realizada pela ação do fator XIIIa (ativado por ação da trombina), de modo que a fibrina forme uma “rede” insolúvel em volta do agregado plaquetário dando origem ao trombo e, finalmente, ocluindo a lesão vascular (MANN et al., 2003; MONROE & HOFFMAN, 2006).

Após a oclusão da lesão, o trombo não deve permanecer indefinidamente no ferimento. Os processos que envolvem a remoção do trombo, bem como a remodelação e proliferação tecidual são fundamentais para o restabelecimento da integridade do organismo. Nesse sentido, um dos primeiros passos é executado pela fibrinólise, que é o processo que realiza gradualmente a remoção dos depósitos de fibrina. O ponto-chave neste processo é a ativação do plasminogênio, um precursor inativo, em plasmina, uma serinoprotease que degrada a rede de fibrina em produtos de degradação solúveis. A ativação da plasmina é mediada principalmente pelo ativador tissular de plasminogênio (tPA) e o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), produzidos pelas células endoteliais, principalmente após a ativação da coagulação. Além disso, a ativação do sistema contato pode levar à conversão de plasminogênio em plasmina. A fibrinólise é um sistema altamente regulado e, em situações fisiológicas, encontra-se inibido. A inibição ocorre nos ativadores de plasminogênio (PA) e também diretamente sobre a plasmina. Os principais inibidores dos PA são o inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), que, em sua maior parte, circula conjugado ao tPA, o PAI-2, a  $\alpha_2$ -antiplasmina e os inibidores de fibrinólise ativados por trombina (TAFI). O estímulo pró-coagulante induz o endotélio e as plaquetas a produzirem receptores celulares de PA que potencializem o processo de

formação de plasmina. A atividade dos PA também é expressivamente aumentada em presença de fibrina. Desse modo, a regulação do sistema fibrinolítico mantém sua ativação vinculada à prévia formação do trombo. Como a remoção da rede de fibrina envolve a recuperação tecidual, o processo de ativação do plasminogênio está intimamente relacionado à indução de remodelação da matriz extracelular, angiogênese, proliferação e migração celular (VAUGHAN & DECLERCK, 1998; CESARMAN-MAUS & HAJJAR, 2005; SILVA & HASHIMOTO, 2006).

Como anteriormente evidenciado, o endotélio vascular desempenha diversas funções no controle da homeostase circulatória. O papel-chave desempenhado pelo endotélio não é relacionado somente aos fenômenos de hemostasia, mas também de regulação do tônus vascular, balanço de fluidos, cicatrização, infiltração tecidual de leucócitos, produção de citocinas e apresentação de antígenos.

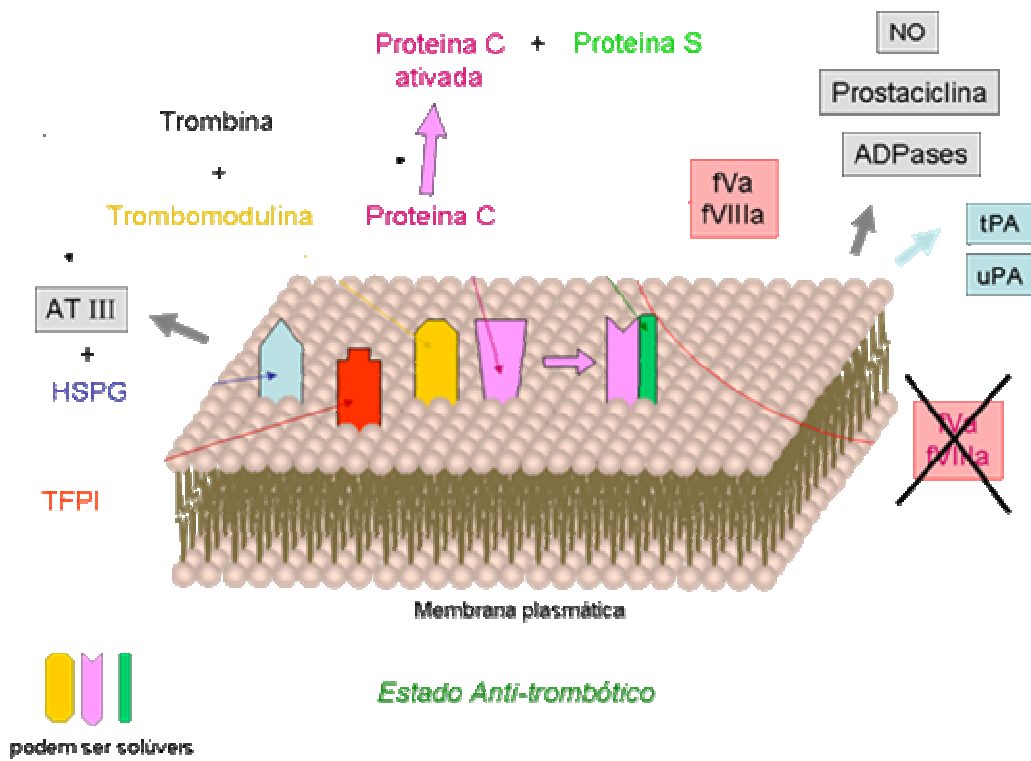
Em condições fisiológicas, o endotélio apresenta um fenótipo anti-inflamatório, anticoagulante e antitrombótico. Este estado antitrombótico é mantido principalmente pela presença de altos níveis de proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG), que agem repelindo moléculas e células negativamente carregadas e potencializando a ação da antitrombina. Além disso, outros mediadores participam ativamente neste processo, como o inibidor da via do fator tissular (TFPI); o complexo trombomodulina/proteína C/proteína S, que reverte a ação protrombótica da trombina em antitrombótica e inibe outros fatores da cascata de coagulação; a prostaciclina, o óxido nítrico e as ADPases, todos inibidores de agregação plaquetária.

No caso de lesões vasculares, inflamação, choque e infecção, o endotélio pode sofrer uma alteração fenotípica, conhecida como ativação endotelial, onde há uma reversão de seu estado antitrombótico para protrombótico. Quando o endotélio é ativado, os fatores

que mantêm seu estado antitrombótico deixam de ser secretados ou expressos na superfície da célula endotelial (**Figura 2**). Ademais, são expostas ou secretadas na membrana plasmática moléculas pró-coagulantes (como TF e PS), algumas moléculas de adesão que participam da migração e extravasamento celular (como selectinas e adesinas) e, ainda, citocinas pró-coagulantes (como o fator de necrose tumoral alfa - TNF- $\alpha$  - e as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6) (GIBBONS, 1998; MAKRIDES & RYAN, 1998; AIRD, 2004; MINAMI et al., 2004; BEHLING-KELLY & CZUPRYNSKI, 2007).



## CÉLULA ENDOTELIAL



## CÉLULA ENDOTELIAL ATIVADA

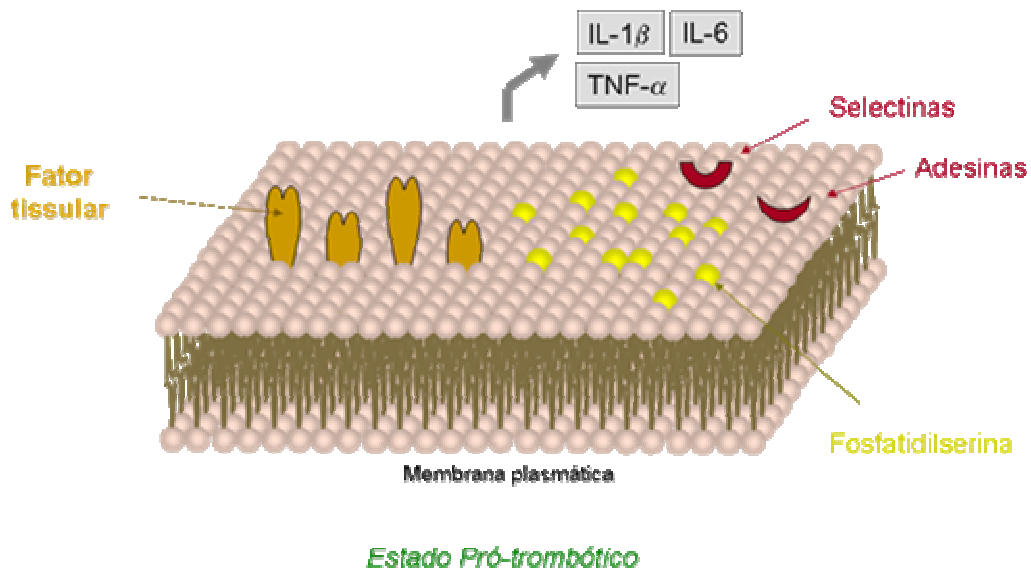


Figura 2 – Desenho esquemático da célula endotelial em repouso e ativada. Elaborado por José Reck Jr (2009)

### 1.3. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

#### 1.3.1. Visão geral, biologia, impacto e controle

Os carrapatos são aracnídeos encontrados em todos os continentes, e pertencentes à subclasse dos ácaros, superordem (ou *coorte*) *Parasitiformes*, ordem *Ixodida*. Os carrapatos estão entre os primeiros aracnídeos que habitaram a terra, sendo seu surgimento estimado há cerca de 300 milhões de anos (MANS & NEITZ, 2004). As primeiras descrições sobre a ocorrência de carrapatos foram encontrados em uma tumba egípcia (de 1500 a.C.), onde desenhos mostravam um animal com parasitos no pavilhão auricular interno. Em obras clássicas de Homero (800 a.C.), Aristóteles (355 a.C.) e Plínio (77 d.C.), também, são encontradas referências e algumas descrições iniciais sobre carrapatos (PEREIRA, 2009a).

Atualmente, são reconhecidas cerca de 870 espécies de carrapatos, que são divididas em duas grandes famílias principais, *Ixodidae* e *Argasidae*. O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, popularmente conhecido como carrapato bovino, é um carrapato pertencente à família *Ixodidae*, que compreende os *hard-ticks* ou carrapatos duros. Esta denominação se dá devido à presença do escudo, uma camada rígida esclerotizada que recobre dorsalmente o idiossoma (corpo do carrapato), completamente nos machos e parcialmente nas fêmeas. O *R. microplus* não possui ornamentações na cutícula, que apresenta coloração cinza-escura, sendo que o escudo dorsal é pouco desenvolvido (GUIMARÃES et al., 2001; PEREIRA, 2009a).

A inclusão das espécies do gênero *Boophilus* no gênero *Rhipicephalus* ocorreu em 2003, visto que até então o carrapato bovino era designado somente como *Boophilus microplus* (MURREL & BARKER, 2003). A nomenclatura original do *R. microplus* referia-se a uma tradução livre para o grego da expressão menor (*micro* e *plus*) – amigo (*philus* ou *philo*) do boi (*Boo* ou *Bos*). MURREL & BARKER (2003), analisando

principalmente dados moleculares de filogenia, dos gêneros *Rhipicephalus* e *Boophilus*, concluíram que as espécies de ambos os gêneros deveriam pertencer a somente um gênero (*Rhipicephalus*), que abrigaria um subgênero (*Boophilus*). O subgênero *Boophilus* abrange as seguintes espécies: *R. microplus*, *R. australis*, *R. annulatus* ou *R. calcaratus*, *R. decoloratus*, *R. kohlsi*, e *R. geigy*. No Brasil, foi relatada apenas a presença de *R. microplus* (PEREIRA, 2009b; LABRUNA et al., 2009).

Supõe-se que o *R. microplus* seja originário da Ásia e tenha sido introduzido em outras regiões através da circulação de bovinos parasitados. Este fato sustenta a explicação de que as raças bovinas de origem europeia (*Bos taurus*) são mais susceptíveis à infestação por *R. microplus* do que as raças de origem asiática, como os zebuínos (*Bos indicus*), que são naturalmente mais resistentes ao parasitismo. Os zebuínos apresentam um maior equilíbrio na dinâmica populacional do parasito e menores efeitos em seu organismo decorrentes da infestação. Esta maior adaptação é devida ao fato de, ao longo de milhares de anos, estes bovinos terem coevoluído juntamente com o carrapato, desenvolvendo, assim, um equilíbrio mais estável na relação parasito-hospedeiro (PEREIRA & LABRUNA, 2009). No Brasil, considera-se que a introdução de espécimes de *R. microplus* tenha ocorrido primeiramente no estado do Rio Grande do Sul, devido à importação de exemplares parasitados de bovinos de raças europeias de países da América Latina, como Chile e Uruguai (MARTINS, comunicação pessoal). O carrapato bovino é distribuído entre os paralelos 32° N e 35° S, ou seja, nas regiões tropicais e subtropicais, zona que compreende principalmente países em desenvolvimento (América Latina, África e Ásia Continental) e importantes áreas de produção de carne bovina (América Latina e Oceania) (GUIMARÃES et al., 2001; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

O único hospedeiro natural do *R. microplus* é o bovino, podendo ser raramente encontrado em outros mamíferos (particularmente outros ruminantes), que dividem a mesma área geográfica. Este fato ocorre, geralmente, apenas em situações de alta carga parasitária no ambiente. No caso de parasitismo em outros hospedeiros que não sejam bovinos, há grande rejeição do hospedeiro ao parasito, principalmente no momento de fixação das larvas infestantes, e muito poucos exemplares de *R. microplus* são capazes de atingir a maturidade, o que, quando ocorre, se dá com grande dificuldade. Ocasionalmente, cervídeos podem servir de hospedeiros que sustentam um parasitismo viável e bem-sucedido, contudo, maiores estudos são necessários para averiguar a adaptação do carrapato ao parasitismo nestes animais (GUIMARÃES et al., 2001; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

O carrapato bovino é um parasito monoxeno, ou seja, permanece toda sua vida parasitária em apenas um hospedeiro (no mesmo indivíduo). O ciclo de vida do *R. microplus* compreende um período parasitário e outro de vida livre (**Figura 3**). O período parasitário dura, em média, três semanas e inicia quando as larvas infestantes encontram o hospedeiro. Apesar das larvas de carrapatos se movimentarem ativamente e serem responsivas a estímulos luminosos, olfativos e térmicos, sendo capazes de identificar, discernir e localizar seu hospedeiro, no caso do *R. microplus*, o início do processo de parasitismo parece ser, fundamentalmente, dependente dos movimentos do hospedeiro. Durante a deambulação sobre o pasto, o bovino depara-se com grupos ou aglomerados de centenas ou milhares de larvas infestantes posicionadas no topo da vegetação, que ficam à espera do hospedeiro e, no momento do encontro, movem-se avidamente em direção ao corpo do bovino (BALASHOV, 1972; GONZALES et al., 1974; GUIMARÃES et al., 2001; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

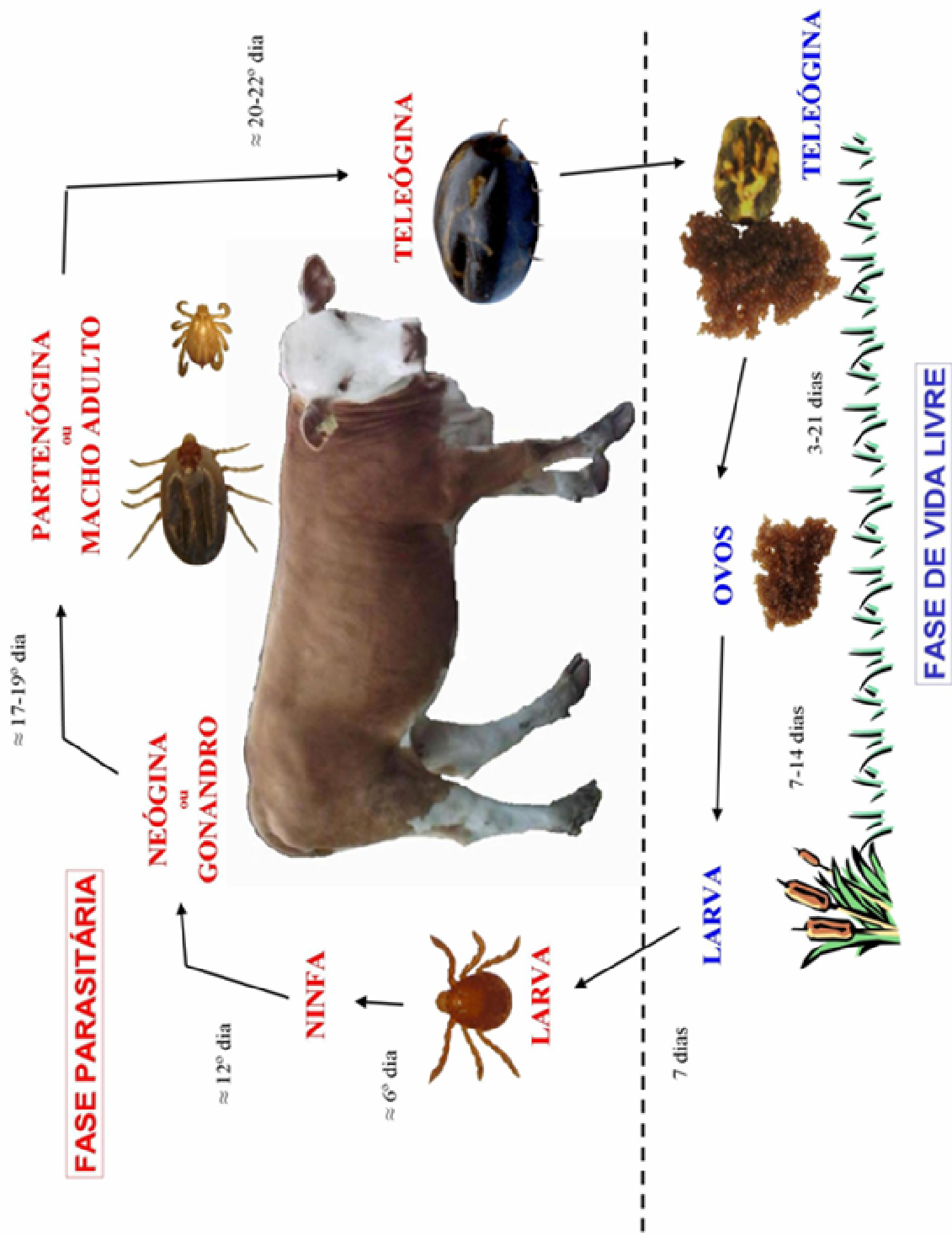


Figura 3 – Desenho esquemático do ciclo de vida do carrapato *R. microplus*. Elaborado por José Reck Jr (2009)

As larvas já possuem a morfologia característica de carrapatos, com evidente separação corporal em gnatossoma (“cabeça falsa”), idiossoma (corpo) e patas, sendo hexápodas e medindo cerca de 0,5 mm. Uma vez no bovino, as larvas movimentam-se no corpo do animal, durante algumas horas, até escolherem seu sítio de fixação e iniciar sua alimentação. As larvas distribuem-se pelo corpo do animal de maneira não-aleatória, fixando-se preferencialmente em locais onde a pele apresente maior temperatura superficial, menor espessura (queratinização) e onde a possibilidade de autorremção por parte do bovino é difícil. Assim, os carrapatos são encontrados principalmente no períneo, úbere, região inguinal, inserção da cauda, face interna superior das patas, escroto, barbela, contorno dos olhos e pavilhão auricular. As larvas de *R. microplus*, após a fixação, iniciam sua alimentação, que, em um primeiro momento, não é baseada em sangue, e sim em exsudato vascular e fluido linfático (BALASHOV, 1972; GONZALES et al., 1974; GUIMARÃES et al., 2001; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

O processo de fixação depende de estruturas altamente especializadas do carrapato. O aparato bucal do *R. microplus* é localizado no gnatossoma, e seus constituintes principais são o hipostômio, as quelíceras e os palpos. O processo de fixação ocorre com o carrapato posicionando-se em um ângulo aproximado de 45° em relação ao hospedeiro, com a base do hipostômio encostando na pele. Os palpos se abrem fornecendo apoio ao parasito e os afiados dígito distais das quelíceras seccionam a pele e os tecidos subjacentes. Parte das quelíceras e do hipostômio é introduzida na pele do hospedeiro, então, iniciando a alimentação do parasito associada ao processo de salivação, que leva à inoculação de diversas moléculas do parasito no hospedeiro. As quelíceras e o hipostômio possuem estruturas denteadas que se dispõem no sentido da fixação do carrapato e que fazem necessária uma tração mecânica intensa para permitir a remoção do parasito. Além das

estruturas anatômicas citadas, a alimentação ainda é dependente da formação de um revestimento que recobre externamente o ponto central da ferida e o aparato bucal do carrapato. Este revestimento é conhecido como cone de cimento (BALASHOV, 1972; GONZALES et al., 1974; GUIMARÃES et al., 2001; PEREIRA & LABRUNA, 2009). O cimento é uma estrutura acelular complexa composta principalmente de lipoproteínas e polissacarídeos, e produzido pelas glândulas salivares como um fluido viscoso que se solidifica e adere firmemente à pele do hospedeiro. Em muitos casos, a remoção mecânica do carrapato durante sua alimentação leva ao desprendimento de parte do gnatossoma e à permanência das peças bucais inseridas na pele e do cimento, que podem acarretar em inflamação e infecções posteriores (BALASHOV, 1972; GONZALES et al., 1974; GUIMARÃES et al., 2001; MARTINS, 2004a; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

Ao longo do ciclo de vida parasitária do *R. microplus*, ocorrem diversas ecdises, que são as responsáveis pelas mudanças de um estágio para outro mais maduro. Durante as ecdises, o *R. microplus* remove suas peças bucais do hospedeiro e permanece fixado geralmente pelo cone de cimento. Apesar de, após a ecdise, o carrapato tender a manter-se fixado no hospedeiro em um local muito próximo do local penetrado no estágio anterior, o parasito geralmente realiza uma nova laceração na pele do hospedeiro. Cerca de aproximadamente 6 dias após a fixação, as larvas infestantes realizam muda e tornam-se ninfas octopodas. As ninfas alimentam-se de sangue por cerca de 6 dias até realizarem nova ecdise, dessa forma, dando origem a adultos imaturos, o que marca o início do dimorfismo sexual, sendo as fêmeas denominadas de neóginas e os machos de gonandros (BALASHOV, 1972; GONZALES et al., 1974; GUIMARÃES et al., 2001; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

Ao atingirem o estágio adulto, as fêmeas fixam-se no ponto que devem permanecer até que seu ciclo parasitário se complete. Os carrapatos adultos atingem a maturidade sexual, aproximadamente, 5 dias após a ecdise anterior. Apesar de ingerirem uma quantidade de sangue muito menor do que as fêmeas em todos os estágios de desenvolvimento, os machos também realizam hematofagia, sendo o repasto sanguíneo importante para o processo de espermatogênese. Ao atingir a maturidade, os machos geralmente param de se alimentar e, guiados por diferentes estímulos, começam a percorrer ativamente o corpo do hospedeiro na procura de fêmeas para o acasalamento. Enquanto a fêmea sexualmente madura tem cerca de 2-4 mm de largura, sendo neste estágio frequentemente designada como partenógina, os machos atingem em média 0,8 mm. Os machos posicionam-se sobre as fêmeas para realizarem a cópula e lá permanecem até que a fêmea inicie seu processo de ingurgitamento rápido. Depois de fecundadas, as fêmeas aumentam consideravelmente sua ingesta de sangue. Por volta do 21º dia de parasitismo, as fêmeas atingem o pico de sua ingesta sanguínea, sendo que, nesse período, seu peso corresponde a 1400% do peso do momento da fixação inicial. Geralmente, ao amanhecer do 22º dia, as fêmeas atingem a repleção máxima (cerca de 8-12 mm de largura) e desprendem-se do hospedeiro caindo no solo. Este acontecimento marca o fim do período parasitário e o início do ciclo de vida livre do *R. microplus* (BALASHOV, 1972; GONZALES et al., 1974; GUIMARÃES et al., 2001; MARTINS, 2004a; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

Uma vez no solo, a fêmea adulta ingurgitada (também designada como teleógina), procura um local úmido e protegido da luz solar para realizar a postura de seus ovos, normalmente junto às raízes da vegetação. A fêmea ainda precisa passar por um período de maturação (denominado de pré-postura) de seu sistema reprodutivo antes de iniciar a



postura, o que leva cerca de 3 dias, em condições ideais de temperatura ( $\approx 27^\circ\text{C}$ ) e umidade ( $\approx 85\%$ ). Nas épocas do ano ou regiões geográficas em que o clima tenda a ser desfavorável, a duração do período pré-postura tende a se estender consideravelmente. Após este período, a fêmea inicia a postura dos ovos, sendo que cada uma pode produzir cerca de 3.000 ovos. A postura dura aproximadamente 14 dias, e, ao fim do processo, ocorre a morte da fêmea. Em condições ambientais favoráveis, a eclosão dos ovos inicia-se cerca de 7 dias após a postura e, por vezes, para que haja a eclosão de todos os ovos são necessários mais alguns dias. Dos ovos, eclodem larvas hexapodas incolores que, após alguns minutos, adquirem sua coloração avermelhada característica. Após cerca de uma semana, as larvas estão aptas a iniciar sua vida parasitária, sendo então denominadas larvas infestantes. É importante ressaltar que cerca de 95% dos carrapatos de uma determinada população são encontrados no ambiente, em sua fase de vida livre, seja sob a forma de larvas ou de fêmeas adultas (BALASHOV, 1972; GONZALES et al., 1974; GUIMARÃES et al., 2001; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

Como visto anteriormente, as condições climáticas são fatores determinante no ciclo do *R. microplus*. Esta influência se dá principalmente sobre os estágios de vida livre do carrapato; em muito menor grau, durante sua vida parasitária. Sob variadas condições ambientais, cuja baixa temperatura parece ser o maior limitante, o tempo entre a queda ao solo e o surgimento de larvas infestantes pode se estender por mais de seis meses. Além disso, em alguns casos, as larvas infestantes, que estão na vegetação, podem sobreviver por mais de oito meses sem alimentar-se frente à escassez de hospedeiros (GONZALES et al., 1974; GUIMARÃES et al., 2001; MARTINS, 2004a; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

O *R. microplus* é considerado o mais importante parasito de animais domésticos da América Latina. Quase a totalidade dos rebanhos de bovinos no Brasil enfrenta, em

diferentes graus, problemas devido à infestação por *R. microplus* (MARTINS, 2004a). Em diversos locais do Brasil, não é incomum alguns animais apresentarem contagens diárias de carrapatos superiores a 200 fêmeas por bovino, o que, durante um intervalo de tempo de duas semanas, resulta em milhares de teleóginas atingindo o grau máximo de repleção e realizando postura no ambiente (LABRUNA & VERISSIMO, 2001). Existem ainda relatos de bovinos a campo apresentando mais de 20.000 carrapatos fixados em diferentes estágios de desenvolvimento (HORN & ARTECHE, 1985). A infestação por carrapatos parece adquirir particular importância nos estados do sul do país, principalmente no Rio Grande do Sul, onde a presença predominante de gado de raças de origem europeia torna o rebanho muito sensível à infestação por carrapato e aos seus efeitos deletérios. Este problema também é marcante nos rebanhos leiteiros de todo o Brasil, onde há grande predominância de gado *Bos taurus* das raças Holandesa (Holstein) e Jersey (MARTINS, 2004a). O grau de parasitismo entre os animais de um mesmo rebanho não apresenta uma distribuição normal, visto que, frequentemente, um grupo de 10% dos bovinos abriga 70% da população total de carrapatos que estão na fase parasitária. Os mecanismos que regem este tipo de distribuição ainda não são compreendidos (SZABÓ, 2009).

O *R. microplus* é responsável por diversos danos aos animais que parasita, principalmente pela espoliação de grandes quantidades de sangue, que acarreta em anemia e em uma série de alterações orgânicas, como anorexia, emagrecimento, apatia, redução da produção de leite e, em casos mais extremos, pode levar à morte do animal. Ademais, a picada do *R. microplus* pode gerar desconforto, prurido, inflamações, infecções secundárias e facilitar a ocorrência de miíases (RIEK, 1957; GUIMARÃES et al., 2001; MARTINS, 2004a; PEREIRA & LABRUNA, 2009). Uma vez que a saliva do carrapato está envolvida na modulação de uma série de reações do hospedeiro para garantir a hematofagia, surge o

conceito de que o carrapato realiza a modulação sistêmica, e não somente local, de diversos fenômenos por meio da inoculação de um coquetel de moléculas farmacologicamente ativas, o que parece ter particular importância nos casos de altas infestações (WIKEL, 1996a). Um exemplo disso parece ser a modulação global negativa do sistema imune de bovinos infestados com *R. microplus* (INOKUMA et al., 1993).

Além dos distúrbios diretamente associados ao parasitismo, o *R. microplus* também é motivo de preocupação por ser o vetor do complexo causador da tristeza parasitária bovina (TPB) (MARTINS et al., 2004b). Segundo a Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio (SEAPPA) do estado do Rio Grande do Sul, a TPB é a principal causa infecciosa de mortes em bovinos no estado (SEAPPA, dados não publicados). A TPB é um complexo de doenças causadas por infecções pelos protozoários *Babesia bovis* ou *B. bigemina* e pela bactéria *Anaplasma marginale*, e que podem ocorrer associadas ou não. Os agentes da TPB são organismos de localização intraeritrocitária, conhecidos genericamente como hemoparasitos. Os sinais clínicos da TPB são prostração e emaciação acentuadas, febre e anemia severa (por hemólise intravascular), levando a palidez de mucosas e/ou icterícia e diversas outras alterações, como abortos e redução na lactação. Na babesiose também é frequente a hemoglobinúria e, quando a infecção é causada por *B. bovis*, há a ocorrência de distúrbios neurológicos causados provavelmente pelo sequestro de eritrócitos parasitados nos capilares do cérebro, de modo similar ao que ocorre nos casos de malária cerebral humana. Os índices de morbidade e letalidade variam bastante entre as regiões, mas, em localidades de alta infestação por carrapatos, podem atingir valores superiores a 50% (GUIMARÃES et al., 2001; MARTINS, 2004b; ALMEIDA et al., 2006).

Visto que o *R. microplus* causa danos ao seu hospedeiro tanto direta quanto indiretamente, este carrapato é um sério problema econômico a ser enfrentado pela pecuária brasileira. Estima-se que a redução do ganho de peso, em um ano, em rebanhos de *Bos taurus* infestados com *R. microplus*, gere uma redução de 9,5 Kg de carne no peso da carcaça em comparação a animais não parasitados. A redução na produção leiteira, em animais infestados, durante longos períodos, pode chegar a 20%. Em 1985, computando-se os gastos com os efeitos do parasitismo, queda de produção, mortes, acaricidas e TPB, estimou-se que o *R. microplus* gerava um prejuízo mínimo de 8 dólares por bovino/ano em média (HORN & ARTECHE, 1985). Considerando-se que virtualmente todo o rebanho brasileiro, composto por 206 milhões de reses, em 2006 (IBGE, 2006), está exposto ao carrapato, pode-se estimar que o prejuízo econômico da pecuária com o carrapato bovino gira em torno de alguns bilhões de dólares anuais.

Desde o início do século XX até hoje, o controle químico é a principal forma de combater o *R. microplus*. Ou seja, o controle é baseado no uso de acaricidas, que podem ser utilizados sob diferentes formas de apresentação, como, por exemplo, em banhos de aspersão e imersão. Posteriormente, foram introduzidas as formulações para uso injetável e de aplicação na linha do dorso (“*pour on*”). Os principais acaricidas empregados atualmente no controle do carrapato bovino são os compostos organofosforados, piretroides, formamidinas (amitraz), lactonas macrocíclicas (avermectinas), fluazuron (inibidores de crescimento/incorporação de quitina) e fipronil (MARTINS, 2004a; LABRUNA, 2009). Contudo, o aparecimento de resistência aos princípios ativos dos acaricidas é frequente e, cada vez mais, relatado. Isto demanda a utilização cuidadosa e planejada de acaricidas para o controle do *R. microplus*, em conjunto com outras medidas de manejo, a partir de um processo conhecido como controle racional. Este procedimento

deve avaliar individualmente o caso de cada localidade/rebanho, utilizando recursos como o teste de avaliação de sensibilidade a acaricidas *in vitro* (conhecido popularmente como biocarrapaticidograma), para identificar o surgimento de resistência aos princípios ativos; e definindo, com base na dinâmica populacional do carrapato, períodos estratégicos para a aplicação do acaricida (KLAFKE, 2009). Além disso, o controle racional envolve medidas auxiliares de manejo como, por exemplo, rotação de pastagens e integração pecuária-lavoura (LABRUNA, 2009).

Os métodos de controle químico, apesar de serem os mais eficientes, são frequentemente criticados pelo seu custo e por apresentarem a inconveniência de poderem gerar resíduos químicos no leite e carne destinados ao consumo humano. Nesse sentido, métodos alternativos de controle também podem ser empregados e são, cada vez mais, alvo de diversos estudos (SAMISH et al., 2008; WILLADSEN, 2008). Uma opção interessante parece ser o controle biológico, que pode envolver tanto o uso de animais predadores, aves e aranhas, como inclusive micro-organismos artropodopatogênicos (SAMISH et al., 2008). O crescente avanço nos estudos sobre as características moleculares da infecção por fungos artropodopatogênicos, como o *Metarhizium anisopliae*, em carrapatos (SANTI et al., 2009; SILVA et al., 2009), em associação a dados relacionados a seu emprego em testes de campo, tornam estes organismos os mais promissores agentes de controle biológico (LEEMON et al., 2008; SAMISH et al., 2008).

Outra abordagem alternativa para o controle do *R. microplus* é o uso de vacinas. Esta opção baseia-se no uso de proteínas do carrapato bovino como antígenos para gerar nos hospedeiros uma resposta imunológica capaz de aumentar a rejeição aos parasitos. Duas vacinas contra o carrapato já foram colocadas à disposição dos produtores. Ambas utilizam como antígeno uma proteína de membrana do intestino do carrapato, a Bm86

(WILLADSEN, 2008). O uso da Bm86, como antígeno, revolucionou a imunologia com a introdução do conceito de antígenos ocultos. Os antígenos ocultos são moléculas do patógeno que, naturalmente, nunca entrariam em contato com o hospedeiro, de modo que não sofreram, ao longo de milhares de anos de evolução, pressão seletiva para não serem reativas ou imunogênicas, mas que, quando administradas no hospedeiro, sob forma de vacinas, podem gerar uma resposta imune protetora no hospedeiro contra futuros desafios (WILLADSEN & MCKENNA, 1991). Em linhas gerais, este raciocínio também explica a relativa falta de antigenicidade da maior parte dos componentes da saliva de animais hematófagos. Visto que as moléculas da saliva entram em contato frequente e duradouro com o hospedeiro e não devem ser neutralizadas pelo sistema imune para efetuar sua função biológica, a pressão evolutiva favoreceu a seleção de indivíduos que inoculavam moléculas farmacologicamente ativas de baixa antigenicidade em seu hospedeiro.

As duas vacinas comerciais contra o carrapato, TickGard® e GAVAC®, obtiveram relativo sucesso em seus países de origem, Austrália e Cuba, respectivamente (WILLADSEN, 2009). Todavia, em outras regiões, provavelmente devido a variações entre as populações de carrapatos, os resultados foram insatisfatórios. Ademais, comparadas com os métodos tradicionais de controle químico, as vacinas apresentavam resultados de proteção parcial associados a um custo significativamente mais elevado. Este fato abalou a credibilidade na viabilidade e no uso das vacinas para parasitos. Nesse sentido, dado o grau de complexidade desses organismos, a crescente demanda por um controle estratégico - que empregue diversas metodologias associadas - e a falta de opções no tratamento de populações de carrapatos que apresentam resistência a múltiplos acaricidas, é importante que haja uma revisão nos critérios de julgamento sobre a viabilidade das vacinas para artrópodos, inicialmente baseados somente na busca de uma capacidade protetora total.

Atualmente, diversas proteínas têm sido alvos de estudos moleculares e testes em animais visando ao futuro emprego como antígenos em uma vacina contra o carrapato.

### *1.3.2. Moléculas farmacologicamente ativas da saliva do R. microplus*

Como qualquer animal hematófago, a saliva do *R. microplus* possui componentes moduladores da resposta do hospedeiro para permitir o parasitismo. Apesar do *R. microplus* ser um dos organismos mais estudados entre os parasitos de animais, a quantidade de informação sobre os componentes farmacologicamente ativos encontrados em sua saliva não é tão abundante em comparação com outros hematófagos, como mosquitos e barbeiros, e mesmo outros carrapatos.

A presença de moléculas vasodilatadoras de natureza não-proteica foi demonstrada na saliva do *R. microplus*. KEMP e colaboradores (1983) estabeleceram que a saliva de *R. microplus* possuía quantidades expressivas de prostaglandinas (PG), principalmente PG F<sub>2α</sub>, que é o mais potente indutor conhecido de vasodilatação na pele bovina. Além de PG F<sub>2α</sub>, a saliva do *R. microplus* possui outros eicosanoides, como PG E<sub>2</sub> e prostaciclina, que podem atuar na inibição da resposta imune e da hemostasia (INOKUMA et al., 1994).

Além de vasodilatadores, o carrapato bovino também possui anticoagulantes que inibem a resposta hemostática no local da picada. HORN e colaboradores (2000) isolaram e caracterizaram um inibidor específico de trombina de aproximadamente 60 kDa, com IC<sub>50</sub> variando entre 100 nM e 1,1 μM, dependendo das condições utilizadas no ensaio. Esta molécula, denominada BmAP, é capaz de prolongar o tempo de coagulação do plasma, mas não apresenta atividade inibitória sobre nenhuma outra serinoprotease testada. Além do BmAP, a saliva do carrapato bovino ainda possui outro inibidor de trombina. Esta

molécula, denominada de microfilina, é um inibidor termorresistente de baixo peso molecular, possuindo cerca de 1770 Da (CIPRANDI et al., 2006). A microfilina é um dos menores inibidores peptídicos conhecidos de trombina, inibindo a atividade de trombina e a coagulação do plasma via ligação ao exsítio I da trombina (CIPRANDI et al., 2006). Além dos inibidores de trombina, BmAP e microfilina, não são conhecidos outros componentes que estejam presentes na saliva ou glândulas salivares do *R. microplus* que sejam capazes de interferir na hemostasia.

Na glândula salivar do carrapato bovino, foi identificada e caracterizada uma metaloprotease capaz de realizar a hidrólise de BK, um dos mais importantes mediadores inflamatórios e algésicos. Esta enzima, denominada Bookase, apesar de apresentar semelhanças à enzima conversora de angiotensina (ACE) dos mamíferos, não possui atividade sobre angiotensina I (BASTIANI et al., 2002). A atividade cininásica (hidrólise de BK) parece não estar presente na saliva de teleóginas de *R. microplus*, apesar de resultados preliminares indicarem que esta pode estar presente na saliva de partenóginas (RECK et al., dados não-publicados).

A infestação por *R. microplus* é um potente modulador sistêmico negativo do sistema imune do bovino (INOKUMA et al., 1993). TURNI e colaboradores (2002, 2004 e 2007), em uma série de trabalhos clássicos, demonstraram que o conteúdo das glândulas salivares de *R. microplus* possui potente atividade imunossupressora *in vitro*, inibindo a proliferação de linfócitos e a capacidade fagocítica e oxidativa de neutrófilos e monócitos. Além disso, o *R. microplus* também possui lectinas salivares que parecem regular negativamente a resposta imune humoral (BAUTISTA-GARFIAS et al., 1997), e outras proteínas que provavelmente estejam relacionadas com a inibição do sistema do complemento (WILLADSEN & RIDING, 1980; FERREIRA et al., 2002).



Além das moléculas citadas anteriormente, o *R. microplus* ainda apresenta atividades do tipo lipase e aminopeptidase na saliva, que podem estar envolvidas com a regulação de diversos fenômenos (KERLIN & HUGHES, 1992). Técnicas de análise molecular, como a transcriptômica e a proteômica, também, estão fornecendo novas informações sobre a composição da saliva e suas prováveis funções modulatórias. A análise de dados de ESTs (SANTOS et al., 2004; WANG et al., 2007) tem indicado a presença de diversas famílias de proteínas nas glândulas salivares do *R. microplus*, entre as quais destacam-se as serpinas (inibidores de serinoproteases), que parecem ser encontradas em grandes quantidades. Resultados preliminares de análise proteômica têm demonstrado que há diferenças significativas na composição da saliva de *R. microplus* de acordo com a fase do desenvolvimento (partenóginas e teleóginas), bem como indicado a presença de diversas proteínas com potencial atividade modulatória nas defesas do bovino (RECK et al., dados não-publicados).

### *1.3.3. Imunoparasitologia: a resistência adquirida*

A infestação por carrapatos em animais seguidamente/permanentemente infestados acarreta, ao longo do tempo, o desenvolvimento de um tipo de resistência ao parasito. Esta resistência é principalmente caracterizada pela redução no número de parasitos e pela atenuação de alguns de seus efeitos nocivos, indicando o surgimento de um equilíbrio mais estável na relação parasito-hospedeiro (BARRIGA et al., 1993; SZABÓ, 2009). Em condições controladas, os parâmetros que indicam a ocorrência de resistência são principalmente representados por diminuição na taxa de recuperação de carrapatos (relação entre o número de carrapatos infestantes e aqueles que efetivamente se alimentaram e se desprenderam do bovino), na sobrevivência dos carrapatos após o término

da alimentação, no peso dos carrapatos alimentados (teleóginas), na quantidade de ovos, na taxa de eclosão dos ovos e no número de animais que conseguem realizar ecdise (BARRIGA et al., 1993; SZABÓ, 2009). Cabe ressaltar aqui que a ocorrência de resistência naturalmente adquirida ao carrapato não se manifesta em todos os bovinos, ocorrendo também significativa variação no grau de proteção entre diferentes animais (SZABÓ, 2009). Além disso, a resistência adquirida pode desaparecer após um intervalo de tempo que o bovino permaneça sem exposição ao parasito (MARTINS, comunicação pessoal). Desse modo, em condições de campo, a resistência adquirida não confere proteção suficiente para dispensar o emprego de métodos de controle do carrapato, como o uso de acaricidas.

Desde os primeiros estudos que evidenciaram a ocorrência de resistência adquirida ao carrapato, diversos pesquisadores têm investigado o mecanismo pelo qual este processo ocorre. O primeiro registro de resistência adquirida ao carrapato bovino relata que animais repetidamente infestados pelo *R. microplus* apresentavam exacerbada reação cutânea no local da picada, o que levava a uma maior rejeição das larvas durante o processo de fixação inicial (JOHNSTON & BANCROFT, 1918). Da mesma maneira, a resistência adquirida a carrapatos foi relatada por Trager (1939), mostrando que cobaias, previamente expostas ao carrapato *D. variabilis*, desenvolviam, em uma segunda infestação, resistência à fixação do carrapato, principalmente devido à formação de um foco inflamatório e rico em células do sistema imune no local da picada, consolidando o conceito de que a resistência adquirida é, em grande parte, mediada pela exacerbação da resposta inflamatória e pela imunidade celular.

Merece menção o trabalho de TATCHELL & BENNETT (1969), que demonstra que bovinos repetidamente infestados por *R. microplus*, que apresentavam resistência

adquirida ao carrapato, tinham o seu *status* de resistente revertido a susceptíveis quando tratados com drogas anti-histamínicas (antagonistas H<sub>1</sub>). Outro célebre trabalho foi executado por ROBERTS & KERR (1976), que estabeleceram que a resistência adquirida em bovinos, após sucessivas infestações, era mediada, pelo menos em parte, por componentes plasmáticos como imunoglobulinas, e poderia ser passivamente transferida para animais sem contato prévio com carrapatos, resultando em graus variados de resistência ao parasita.

Recentemente, PIPER e colaboradores (2008; 2009), em uma série de trabalhos de análise de expressão gênica, forneceram novas informações que podem contribuir para a caracterização da resposta de resistência *in vivo* ao *R. microplus*. Os trabalhos investigando o papel do sistema imune no desenvolvimento da rejeição ao parasitismo foram (e ainda são) o principal estímulo para a pesquisa de vacinas contra o carrapato, que, por sua vez, visam a induzir imunidade e resistência mesmo antes da exposição ao parasito (WILLADSEN, 2009).

Apesar de diversos estudos, principalmente nos últimos anos, abordarem os mecanismos de desenvolvimento da resposta imune durante a infestação pelo *R. microplus*, diversas questões permanecem sem compreensão (BROSSARD & WIKEL, 2008). Entre os pontos que ainda necessitam de um maior entendimento, estão, por exemplo: (i) a maneira pela qual os mecanismos modulatórios da saliva são neutralizados em animais resistentes, bem como quais moléculas são neutralizadas; (ii) o que determina a ocorrência de resistência em alguns animais e não em outros; (iii) quais fatores do hospedeiro determinam a expressiva variação no grau de proteção entre diferentes indivíduos; (iv) qual mecanismo molecular determina que bovinos *Bos indicus* desenvolvam uma resistência adquirida, após sucessivas infestações, muito mais efetiva do que *Bos taurus*; (v) é viável

selecionar animais que apresentem uma resposta adquirida mais eficiente ao carrapato; (vi) a exacerbação da inflamação no sítio de fixação do carrapato é mediada exclusivamente por uma reação de hipersensibilidade; (vii) por que a resistência adquirida ao carrapato é manifestada principalmente frente às formas larvais; (viii) qual a exata participação da resposta imune inata e adaptativa no processo de geração de resistência; (ix) considerando a resposta imune adaptativa, qual a parcela de contribuição da resposta humoral e da celular; e (x) qual a ação exata dos componentes do sistema imune do hospedeiro no interior do carrapato após serem ingeridos. As respostas a esses questionamentos, associadas ao estudo dos mecanismos do carrapato que modulam as defesas do bovino, devem fornecer mais subsídios para a compreensão das bases que regem a relação parasito-hospedeiro e o seu delicado equilíbrio.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são explorar os mecanismos farmacológicos pelos quais a saliva do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* modula a hemostasia, bem como o papel que esta regulação desempenha na relação parasita-hospedeiro. Nesse sentido, os objetivos específicos consistem em:

- Avaliar se a infestação pelo carrapato *R. microplus* é capaz de modular sistemicamente a hemostasia do bovino.
- Realizar a identificação dos mecanismos anti-hemostáticos presentes na saliva de *R. microplus*.
- Determinar se a ocorrência do quadro de resistência naturalmente adquirida contra o carrapato está relacionada com a capacidade de interferência na atividade farmacológica dos anti-hemostáticos da saliva.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL & RESULTADOS

Esta seção está organizada em duas partes que compreendem a descrição do trabalho experimental da dissertação, sob a forma de dois artigos publicados em revistas científicas durante o período de execução do mestrado.

#### 3.1. Parte I

*Systemic alterations of bovine hemostasis due to Rhipicephalus (Boophilus)  
microplus infestation*

Artigo científico publicado no periódico *Research in Veterinary Science*

(v. 86, p. 56-62, 2009)

Neste trabalho, descreve-se que a infestação pelo carrapato *R. microplus*, além de realizar a inibição local dos processos hemostáticos no sítio de fixação do parasito, é capaz de modular sistemicamente a hemostasia do bovino. A modulação global da hemostasia é relatada, pela primeira vez, associada ao parasitismo hematófago. O estudo demonstra que a capacidade modulatória dos componentes salivares do carrapato é muito mais potente do que inicialmente assumido; ademais, o trabalho fortalece o conceito emergente de que a infestação por carrapatos realiza uma modulação sistêmica expressiva, e não somente local, das respostas do hospedeiro, o que parece ter particular importância nos casos de altas infestações.

## Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation

J. Reck Jr.<sup>a,b</sup>, M. Berger<sup>a</sup>, R.M.S. Terra<sup>a</sup>, F.S. Marks<sup>b</sup>, I. da Silva Vaz Jr.<sup>a,b</sup>,  
J.A. Guimarães<sup>a</sup>, C. Termignoni<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, P. O. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

### Abstract

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a hematophagous ectoparasite that causes considerable economic losses to cattle breeding. Although *R. microplus* saliva contains several molecules that interfere with the blood coagulation process, so far the systemic alterations in the host hemostatic system have not been described. This study aims to determine if *R. microplus* infestation induces any disturbance to the host's hemostatic system. To address these questions, six calves were experimentally infested with 20,000 *R. microplus* larvae and their blood was collected before and 7, 14 and 21 days post-infestation. Collagen and ADP-induced platelet aggregation as well as coagulation (activated partial thromboplastin time and prothrombin time) decreased in infested bovines. Platelet blood count and fibrinogen increased during the course of infestation, probably as a compensatory response. These alterations may play a role in host health status, and show that the host cannot fully counteract the tick anti-hemostatic mechanisms.  
© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; Cattle tick; Hemostasis; Platelet; Coagulation; Hemostatic disorders

### 1. Introduction

The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Murrell and Barker, 2003) is a one-host tick, and is considered the most harmful bovine parasite (Jongejan and Uilenberg, 2004). *R. microplus* causes expressive losses in cattle breeding, since it is distributed between latitude 32° N and 35° S, including wide and important beef production zones like South America and Oceania (Stone, 1963). Some of the negative consequences of tick infestation to cattle breeding are anaemia (Riek, 1957), loss in milk and beef production (Cor-

rier et al., 1979; Jonsson, 2006), and transmission of diseases like *Babesia* spp. and *Anaplasma* spp. (Cafrune et al., 1995). Currently, *R. microplus* control strategies are based on chemical acaricides (George et al., 2004). Nonetheless, due to problems related to acaricide resistance (Leite et al., 1995), drug residues in beef and milk (Alvinerie et al., 1999), and high costs of acaricides (Samish, 2000), alternative methods are under development to allow more efficient control (Jongejan, 1998; Sonenshine et al., 2006). These include vaccines (da Silva Vaz et al., 1998) and biological control (Frazzon et al., 2000; Samish, 2000). Thus, more knowledge about the host-parasite relationship is necessary in order to devise new approaches to tick control.

Like all hematophagous animals, ticks resort a variety of molecules in order to avoid hemostatic- (Ciprandi et al., 2003; Ribeiro 1995), inflammatory- (Bastiani et al., 2002) and immunological responses (Wikel et al., 1994),

\* Corresponding author. Address: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, P.O. 9500, 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33086082; fax: +55 51 33087309.

E-mail address: [ctermignoni@cbiot.ufrgs.br](mailto:ctermignoni@cbiot.ufrgs.br) (C. Termignoni).

which in turn allow a successful blood-meal. Hemostasis is a physiological mechanism that avoids blood loss, and depends on a fine balance between vasoconstriction, platelet aggregation, coagulation, anti-coagulation and fibrinolysis (Simmonds and Lane, 1998). Recently, the hemostatic mechanism hypothesis was restructured, and the classical cascade model that distinguished intrinsic from extrinsic pathways became obsolete (Hoffman and Monroe, 2001). This new hypothesis was called the cell-based hemostasis model, and proposes that coagulation takes place on the cell surface in three steps: initiation, amplification, and propagation (Veldman et al., 2003). The cell-based model allows a better understanding of the hemostatic responses *in vivo*, and gives more insights to elucidate mechanisms related with coagulation disorders (Hoffman, 2003).

There are many reports of molecules from hematophagous parasites able to interfere within hemostasis, such as platelet aggregation inhibitors (Ribeiro et al., 1985, 1991; Mans and Neitz, 2004a) and coagulation protease inhibitors (Gordon and Allen, 1991; Hellman and Hawkins, 1967). Indeed, two thrombin inhibitors have been identified and characterized in *R. microplus* saliva by our group (Horn et al., 2000; Ciprandi et al., 2006). Despite the variety of anti-hemostatic molecules identified in hematophagous arthropods (Mans and Neitz, 2004b), there is no report about systemic alterations in host hemostasis produced by tick infestation. This study aimed to investigate the occurrence of hemostatic disorders in bovines infested with *R. microplus*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks of the Porto Alegre strain free of *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. were maintained on infested Hereford bovines (*Bos taurus*) acquired from a tick-free area. All bovines were housed in individual tick-proof pens on slatted floors. All procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching (FASS, 1999).

Six calves (10–12 months old) were infested with 20,000 10-day-old *R. microplus* larvae per animal. The tick attaches on the host as larvae, the larvae moult to nymphs and develops to adult females and non-engorging males that mate before engorged females drop. Tick females remained feeding at the same point until full engorgement was reached. Total life cycle on the host takes roughly 21 days (Guimarães et al., 2001).

After the cycle on the host is completed, fully engorged females dropped from calves and were maintained in Petri dishes at 26–28 °C and 80% relative humidity until completion of ovoposition. One gram of egg samples were kept in disposable tubes under the same conditions as above and monitored daily until hatching. Larvae were maintained in

similar conditions and used to infest bovines after 10 days. The experimental infestation procedure allowed to recover  $1690 \pm 767$  engorged female ticks per bovine (mean  $\pm$  S.D.).

### 2.2. Blood sample

Bovine blood samples were collected by jugular vein puncture, before (day 0) and 7, 14 and 21 days post-infestation with *R. microplus* larvae using vacuum blood collection plastic tubes (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, USA) containing sodium citrate 3.2% as anti-coagulant (Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA). Platelet rich plasma (PRP) for the platelet aggregation assay and Platelet poor plasma (PPP) for coagulation tests were obtained by blood centrifugation at 200 g (three times for 5 min) and 1500 g (10 min), respectively.

### 2.3. Determination of platelet counts and agonist-induced aggregation

Platelet aggregation capacity was measured by the *in vitro* photometric method (Born and Cross, 1963), in an optical aggregometer (Chrono-Log Co., Havertown, USA). Aggregation was measured by the decrease rate in PRP (300  $\mu$ L) optical density (absorbance) induced by the addition of an agonist agent: 10  $\mu$ M adenosine diphosphate (ADP) (Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA) or 3  $\mu$ M bovine collagen type I. For the sake of data comparison, the value obtained on day 0 (control) was considered as 100% aggregation. The platelet blood count was performed manually in a Neubauer chamber (hemocytometer) using optical microscopy.

### 2.4. Coagulation tests

The activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT) and recalcification time (RT) assays have been widely employed to evaluate human and domestic animal coagulation (Parry, 1989). RT is considered a screening test for global coagulation (Spillert and Lazaro, 1993). The aPTT test measures the activity of coagulation factors XII, XI, IX, VIII, while the PT test measures the activity of factor VII, and both assays measure the activity of factors X and V, prothrombin and fibrinogen (Parry, 1989).

Activated partial thromboplastin time (aPTT) was evaluated using the aPTTtest Ellagico kit (Wiener Lab, Rosario, Argentina) and PT was measured using Soluplastin kit (Wiener Lab, Rosario, Argentina). RT was assessed as previously described (Berger et al., 2008). All assays were conducted using a 96-well microplate spectrophotometer (SpectraMax, Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA) equipped with temperature control and shaking functionality.

### 2.5. Fibrinogen and plasma protein determination

Fibrinogen concentration was measured according to Claus (1957). Total plasma protein concentration was



determined by the modified bichinchonic acid method (BCA™ Protein Assay, Pierce, Rockford, USA) as previously described (Bohrer et al., 2007) in order to determine if fibrinogen alteration was due to a global plasma protein change.

### 2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of  $n$  animals. Statistical significance was analyzed by the Student's  $t$  test for paired samples, using day 0 as control. A  $p$  value below 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 3.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 3. Results

### 3.1. Platelets count and aggregation

Platelet function was significantly reduced throughout infestation, becoming more accentuated on the last day (21) of *R. microplus* parasitic life (Fig. 1 and 2). The collagen induced-platelet aggregation gradually decreased by 10% (day 7) as compared to the control, and dropped continuously throughout infestation, reaching 65% as compared to the control on day 21 post-infestation (Fig. 1). ADP-induced aggregation was also reduced by 30% during infestation (Fig. 2). Interestingly, in spite of the decrease in platelet aggregation, platelet blood counts significantly increased over 40% (Fig. 3).

### 3.2. Coagulation profile

The aPTT significantly increased from  $\pm 35$  s on day 0 to  $\pm 55$  s on day 14 post-infestation. It continuously increased until day 21, that is, the entire duration of the tick life cycle on the host (Fig. 4). A reduction in coagulation ability (aPTT increase) was observed 14 days after the beginning

of infestation. PT also increased during the infestation, although the increase in clotting time was observed earlier than the conduction of the aPTT test. The PT value increased from  $\pm 17$  s on day 0 to  $\pm 24$  and  $\pm 26$  s on days 7 and 14 post-infestation, respectively. After 21 days, the PT value took on again the control value (Fig. 5). RT was not significantly altered during the course of infestation (data not shown).

### 3.3. Fibrinogen and total plasma protein

Plasma fibrinogen levels increased about twice on day 14 post-infestation and remained high until day 21, in comparison with the values obtained before infestation (control, day 0) (Fig. 6). Besides, plasma protein levels were not significantly altered during infestation (Fig. 6).

## 4. Discussion and conclusions

Ixodidae ticks, which include *R. microplus*, can exert several systemic effects such as immuno-suppression (Wikel et al., 1996), leukocyte modulation (Turni et al., 2002), complement inhibition (Ribeiro and Spielman, 1986), skin inflammatory lesions (Allen et al., 1977), and anaemia (Corrier et al., 1979). Paradoxically, although the host-tick relationship is among the most extensively studied host-parasite associations, the amount of information on host reactivity to ectoparasites is not enough to afford a comprehensive understanding of this relationship (Wikel et al., 1996).

This study investigated the occurrence of systemic alterations in the hemostatic system of bovines experimentally infested with *R. microplus*. The infestation load chosen was similar to those utilized by other research groups to study tick effects on host health (Tatchell and Bennett, 1969; Opdebeeck et al., 1989; Riding et al., 1994; Andreotti, 2007). Tick burden,  $1690 \pm 767$  engorged females per bovine, was in accordance with our other studies when,

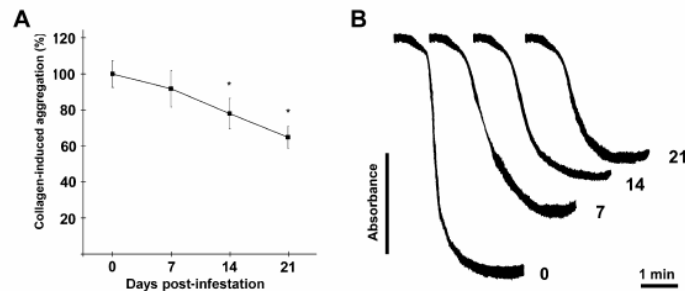


Fig. 1. Collagen induced-platelet aggregation of platelet rich plasma (PRP) from experimentally tick-infested bovines. The platelet aggregation assay of bovine PRP induced by  $3 \mu\text{M}$  of bovine collagen type I was performed before (day 0) and 7, 14 and 21 days post-infestation with *R. microplus*. Panel A, each point represents the mean from six animals, and vertical lines indicate the S.E.M. Statistical analyses were performed using the Student's  $t$  test for paired samples, using day 0 as control for comparison with experimental values. ( $*p < 0.05$ ). Panel B, collagen induced-platelet aggregation profile of calf I before (day 0) and 7, 14 and 21 days post-infestation.

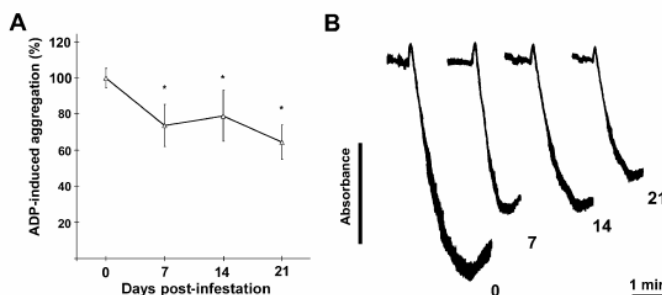


Fig. 2. ADP-induced platelet aggregation of platelet rich plasma (PRP) from experimentally tick-infested bovines. The platelet aggregation assay of bovine PRP induced by 10  $\mu$ M of adenosine diphosphate (ADP) was performed before (day 0) and 7, 14 and 21 days post-infestation with *R. microplus*. Panel A, each point represents the mean from 6 animals and vertical lines indicate the S.E.M. Statistical analyses were performed using the Student's t test for paired samples, using day 0 as control for comparison with experimental values. (\* $p < 0.05$ ). Panel B, ADP-induced platelet aggregation profile of calf 6 before (day 0) and 7, 14 and 21 days post-infestation.

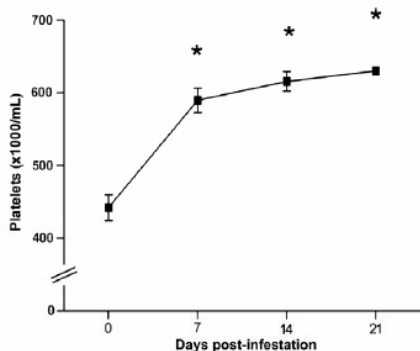


Fig. 3. Platelet blood count in experimentally tick-infested bovines. Platelet blood count was determined before (control, day 0) and days 7, 14 and 21 post-infestation with *R. microplus*. Each point represents the mean of 6 animals and vertical lines show S.E.M. Statistical analyses were performed using the Student's t test for paired samples, using day 0 as control for comparison with experimental values. (\* $p < 0.05$ ).

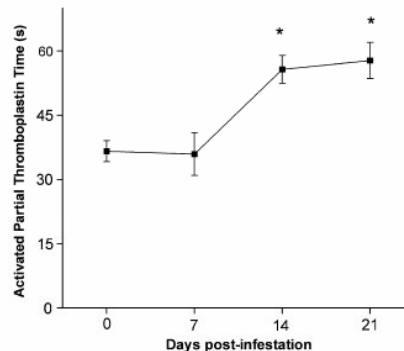


Fig. 4. Activated partial thromboplastin time (aPTT) from experimentally tick-infested bovines. The coagulation ability of bovine plasma measured by the aPTT test was evaluated before (day 0) and days 7, 14 and 21 post-infestation with *R. microplus*. Each point represents the mean of 6 animals and vertical lines show S.E.M. Statistical analyses were performed using the Student's t test for paired samples, using day 0 as control for comparison with experimental values. (\* $p < 0.05$ ).

as a rule, 5–10% of larvae developed into fully engorged females (da Silva Vaz et al., 1994; da Silva Vaz et al., 1998; Leal et al., 2006). Although the parasite load may seem high, in many field situations the tick count in one day can reach more than 200 ticks per animal (Labruna and Verissimo, 2001), leading to more than 1000 engorged female ticks dropped in two weeks. The data demonstrated that infestation can modulate the host's hemostatic system. Platelet aggregation ability, induced by ADP and collagen, decreased throughout infestation (Figs. 1 and 2). Maximum decrease in platelet aggregation occurred on day 21 post-infestation, which coincided with *R. microplus* rapid feeding phase. Probably, it is at this period that the highest quantity of saliva is inoculated in the host, as reported in research on salivary gland physiology (Bowman and Sauer, 2004). Despite the high number of tick platelet aggregation

inhibitors studied *in vitro* (Ribeiro et al., 1985, 1991; Mans and Neitz, 2004a), this paper is the first report showing *in vivo* antiplatelet activity in the course of tick infestation. Platelet inhibition is crucial to allow a successful blood-meal, since the formation of a platelet plug, due to platelet aggregation, is one of the earliest hemostatic responses to avoid blood loss (Kroll and Sullivan, 1998).

Despite the decrease in platelet aggregation, the platelet blood count significantly increased during infestation (Fig. 3). This thrombocytosis may occur probably due to blood loss and tissue damage (Barbui and Finazzi, 1998) caused by *R. microplus* infestation. The data suggest that this alteration could be an important host physiological response to tick parasitism.

The effects of *R. microplus* infestation on the host blood coagulation were also studied using aPPT, PT, and RT

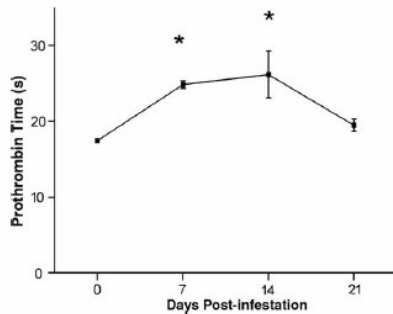


Fig. 5. Prothrombin time (PT) from experimentally tick-infested bovines. The coagulation ability of bovine plasma measured by the PT test was evaluated before (day 0) and days 7, 14 and 21 post-infestation with *R. microplus*. Each point represents the mean of 6 animals and vertical lines show S.E.M. Statistical analyses were performed using the Student's t test for paired samples, using day 0 as control for comparison with experimental values. (\* $p < 0.05$ ).

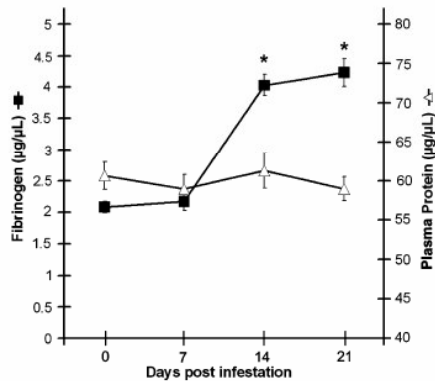


Fig. 6. Fibrinogen and plasma protein levels in experimentally tick-infested bovines. The fibrinogen (closed squares) and total plasma protein (open triangles) levels of bovine platelet poor plasma (PPP) was evaluated before (day 0) and days 7, 14 and 21 post-infestation with *R. microplus*. Each point represents the mean of 6 animals and vertical lines show S.E.M. Statistical analyses were performed using the Student's t test for paired samples, using day 0 as control for comparison with experimental values. (\* $p < 0.05$ ).

assays to determine the coagulation profile during *R. microplus* infestation. aPTT, which measures the activities of coagulation factors XII, XI, IX, VIII, X, V, prothrombin and fibrinogen (Parry, 1989), was significantly high in bovines infested with ticks on day 14 and 21 post-infestation (Fig. 4). PT, which in turn measures the activities of coagulation factors VII, X, V, prothrombin and fibrinogen (Parry, 1989), increased significantly in calves infested with ticks on days 7 and 14 post-infestation (Fig. 5). Interestingly, along the course of the experiment no significant alterations were observed in RT (data not shown). These

different results could be related to the characteristics of each assay and are reported in other studies concerning coagulation abnormalities (Dauguschies et al., 1998; Cury et al., 2002). Among those three tests, PT was the most sensitive assay, and was able to detect earlier hemostatic alterations in plasma (Lerner and Goldstein, 1973), which could explain why PT increase was observed on day 7 in contrast to aPTT increase, which occurred only 14 days post-infestation. The fact that the RT assay is unable to detect any alteration in coagulation of infested calves could be attributed to its ability to generate highly variable data, due to a wide range of normal values. Moreover, this assay has also a low sensitivity to slight deficiencies of some coagulation factors (Hunter and Allensworth, 1967).

The coagulation disturbance observed in infested calves could be attributed to the action of several anti-hemostatic molecules of *R. microplus* (for a review see Maritz-Olivier et al., 2007). However, as only two thrombin (Horn et al., 2000; Ciprandi et al., 2006) and one kallikrein (Reck et al., 2005) inhibitors were proved to be present in the tick saliva as active anti-hemostatic proteins, it is likely that these molecules are inoculated into the host and play a key role in the coagulation disorders reported here. Thrombin inhibition directly decreases fibrin formation from fibrinogen and also enhances the positive feed-back through the activation of factors XI, V and VIII-von Willebrand factor complex (Roberts et al., 2006). Moreover, the inhibition of fXII activation by kallikrein, via contact system pathway, could also intensify the overall effect (Yarovaya et al., 2002).

Fibrinogen level was significantly altered during *R. microplus* infestation, being two times higher than the control value (Fig. 6). It is reasonable to conclude that this increase is not correlated to any alteration in total plasma protein, and seems to be a host response to blood loss and vessel injury (Gibbons, 1998).

The occurrence of acquired hemostatic disorders in domestic animals is often reported for viral (Hart and Nolte, 1994), bacterial (Culley et al., 2005), protozoan (Valladares et al., 1998) and helminthic (Cury et al., 2002) diseases, whereas *in vivo* hemostatic alterations caused by ectoparasites have never been reported before. This is the first report showing *in vivo* antiplatelet and anti-coagulatory activities throughout tick infestation, despite the large number *in vitro* studies addressing tick anti-hemostatics (Hellman and Hawkins, 1967; Ribeiro et al., 1985, 1991; Gordon and Allen, 1991; Horn et al., 2000; Mans and Neitz, 2004a; Ciprandi et al., 2006).

The data obtained support the hypothesis that the alterations observed were due to two different mechanisms: (i) action of parasite salivary molecules injected in the host's circulation, inhibiting platelet aggregation (Figs. 1 and 2) and coagulation (Figs. 4 and 5); (ii) bovine compensatory responses to parasitism, in order to counterattack the parasite as evidenced by platelet blood count (Fig. 3) and fibrinogen (Fig. 6) increases.

This study described the systemic alterations in the host's hemostatic system produced by *R. microplus* infesta-

tion, which is critical to parasitism and the host health status. The data reinforce the importance to understand the phenomena occurring in the host during parasitism, affording a more thorough understanding of the hematophagy mechanism and improving the knowledge on the pathophysiological mechanisms behind host-tick interaction.

#### Acknowledgements

We are indebted to Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Programa Nacional de Excelência (PRONEX) for financial support. Special thanks to Prof. Brasília Ricardo Cirillo da Silva for help in statistical analysis (Departamento de Estatística – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS) and to Prof. Alexandre José Macedo (Centro de Biotecnologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS) for critical review of this manuscript.

#### References

- Allen, J.R., Doube, B.M., Kemp, D.H., 1977. Histology of bovine skin reactions to *Ixodes holocyclus*. Canadian Journal of Comparative Medicine 41, 26–35.
- Alvinerie, M., Sutra, J.F., Galtier, P., Mage, C., 1999. Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following topical administration to lactating dairy cattle. Research in Veterinary Science 67, 229–232.
- Andreotti, R., 2007. A synthetic BMTI N-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. Experimental Parasitology 116 (1), 66–70.
- Barbui, T., Finazzi, G., 1998. Thrombocytosis. In: Loscalzo, J., Schafer, A.I. (Eds.), Thrombosis and hemorrhage, second ed. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 665–681.
- Bastiani, M., Hillebrand, S., Horn, F., Kist, T.B.L., Guimarães, J.A., Termignoni, C., 2002. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32, 1439–1446.
- Berger, M., Pinto, A.F., Guimarães, J.A., 2008. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. Toxicon 51 (4), 488–501.
- Bohrer, C.B., Reck Jr., J., Fernandes, D., Sordi, R., Guimarães, J.A., Assreuy, J., Termignoni, C., 2007. Kallikrein-kinin system activation by *Lonomia obliqua* caterpillar bristles: involvement in edema and hypotension responses to envenomation. Toxicon 49 (5), 663–669.
- Born, G.V.R., Cross, M.J., 1963. The aggregation of blood platelets. Journal of Physiology 168, 178–195.
- Bowman, A.S., Sauer, J.R., 2004. Tick salivary glands: function, physiology and future. Parasitology 129, S67–S81.
- Cafrune, M.M., Aguirre, D.H., Mangold, A.J., Guglielmo, A.A., 1995. Experimental studies of the rate of infection of *Boophilus microplus* eggs with *Babesia bovis*. Research in Veterinary Science 58, 284–285.
- Ciprandi, A., Horn, F., Termignoni, C., 2003. Saliva of hematophagous animals: source of new anticoagulants. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 25, 250–262.
- Ciprandi, A., Oliveira, S.K., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C., 2006. *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. Experimental Parasitology 114, 40–46.
- Claus, V.A., 1957. Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. Acta Haematologica 17, 237.
- Corrier, D.E., Vizcaino, O., Terry, M., Betancourt, A., Kuttler, K.L., Carson, C.A., Trevino, G., Ristic, M., 1979. Mortality, weight loss and anaemia in *Bos taurus* calves exposed to *Boophilus microplus* ticks in the tropics of Colombia. Tropical Animal Health and Production 11, 215–221.
- Culley, N.C., Pinson, D.M., Chakrabarty, A., Mayo, M.S., Levine, S.M., 2005. Pathophysiological manifestations in mice exposed to anthrax lethal toxin. Infection and Immunity 73, 7006–7010.
- Cury, M.C., Limab, W.S., Guimarães, M.P., Carvalho, M.P., 2002. Hematological and coagulation profiles in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). Veterinary Parasitology 104, 139–149.
- da Silva Vaz Jr., I., Ozaki, L.S., Masuda, A., 1994. Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. Veterinary Parasitology 52 (1–2), 71–78.
- da Silva Vaz Jr., I., Logullo, C., Sorgine, M., Velloso, F.F., Rosa de Lima, M.F., Gonzales, J.C., Masuda, H., Oliveira, P.L., Masuda, A., 1998. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. Veterinary Immunology and Immunopathology 66, 331–341.
- Dauguschies, A., Rupp, U., Rommel, M., 1998. Blood clotting disorders during experimental sarcocystiosis in calves. International Journal for Parasitology 28, 1187–1194.
- FASS, 1999. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching, first ed. Federation of Animal Science Societies, Savoy.
- Frazzon, A.P., da Silva Vaz Jr., I., Masuda, A., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. Veterinary Parasitology 94, 117–125.
- George, J.E., Pound, J.M., Davey, R.B., 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. Parasitology 129, S353–S366.
- Gibbons, G.H., 1998. The Vascular Response to Injury. In: Loscalzo, J., Schafer, A.I. (Eds.), Thrombosis and Hemorrhage, second ed. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 307–320.
- Gordon, J.R., Allen, J.R., 1991. Factors V and VII anticoagulants activities in the salivary glands of feeding *Dermacentor andersoni*. Journal of Parasitology 77, 167–170.
- Guimarães, J.H., Tucci, E.C., Barros-Battesti, D.M., 2001. Ectoparasitos de importância veterinária, first ed. Editora Pleiade, São Paulo.
- Hart, S.W., Nolte, I., 1994. Hemostatic disorders in feline immunodeficiency virus-seropositive cats. Journal of Veterinary Internal Medicine 8, 355–362.
- Hellman, K., Hawkins, R.I., 1967. The action of tick extract on blood coagulation and fibrinolysis. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica 18, 617–625.
- Hoffman, M., 2003. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. Blood Reviews 17, S1–S5.
- Hoffman, M., Monroe, D.M., 2001. A cell-based model of hemostasis. Thrombosis and Hemostasis 85, 958–965.
- Horn, F., Santos, P.C., Termignoni, C., 2000. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. Archives of Biochemistry and Biophysics 384, 68–73.
- Hunter, D.T., Allensworth, J.L., 1967. Improved coagulation screening by an activated recalcification test. Journal of Clinical Pathology 20, 244–248.
- Jongejan, F., 1998. Integrated control of ticks and tick-borne diseases (ICTTD). Parasitology Today 14, 173–176.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. Parasitology 129, S3–S14.
- Jonsson, N.N., 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. Veterinary Parasitology 137, 1–10.
- Kroll, M.H., Sullivan, R., 1998. Mechanisms of Platelet Activation. In: Loscalzo, J., Schafer, A.I. (Eds.), Thrombosis and Hemorrhage, second ed. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 261–293.

- Labruna, M.B., Verissimo, C.J., 2001. Notes on infestation by *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle, under rotational grazing and high stocking rate. *Arquivos do Instituto Biológico* 68 (2), 115–120.
- Leal, A.T., Seixas, A., Pohl, P.C., Ferreira, C.A., Logullo, C., Oliveira, P.L., Farias, S.E., Termignoni, C., da Silva Vaz Jr., I., Masuda, A., 2006. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114 (3–4), 341–345.
- Leite, R.C., Labruna, M.B., Oliveira, P.R., Monteiro, A.M.F., 1995. In vitro susceptibility of engorged females from different populations of *Boophilus microplus* to comercial acaricides. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 4, 283–294.
- Lerner, R.G., Goldstein, R., 1973. Tests of coagulation. Use and interpretation. *Medical Clinics of North America* 57 (6), 1609–1616.
- Mans, B.J., Neitz, A.W., 2004a. The mechanism of  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  antagonism by savignygrin and its implications for the evolution of anti-hemostatic strategies in soft ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 573–584.
- Mans, B.J., Neitz, A.W., 2004b. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 1–17.
- Maritz-Olivier, C., Stutzer, C., Jongejan, F., Neitz, A.W., Gaspar, A.R., 2007. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends in Parasitology* 23 (9), 397–407.
- Murrell, A., Barker, S.C., 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology* 56, 169–172.
- Opdebeeck, J.P., Wong, J.Y.M., Dobson, C., 1989. Hereford cattle protected against *Boophilus microplus* with antigens purified by immunoaffinity chromatography from larval and adult ticks. *Immunology* 67, 388–393.
- Parry, B.W., 1989. Laboratory evaluation of hemorrhagic coagulopathies in small animal practice. *The Veterinary Clinics of North America—Small Animal Practice* 19, 729–742.
- Reck Jr., J., Bohrer, C.B., Termignoni, C., 2005. Modulação da resposta inflamatória no parasitismo do carrapato bovino *Boophilus microplus*. *Revista de Patologia Tropical* 34 (S1), 22.
- Ribeiro, J.M., 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents and Diseases* 4, 143–152.
- Ribeiro, J.M., Endris, T.M., Endris, R., 1991. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 100, 109–112.
- Ribeiro, J.M., Makoul, G.T., Levine, J., Robinson, D.R., Spielman, A., 1985. Anti-hemostatic, anti-inflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *Journal Experimental Medicine* 161, 332–344.
- Ribeiro, J.M., Spielman, A., 1986. *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Experimental Parasitology* 62, 292–297.
- Riding, G.A., Jarmey, J., McKenna, R.V., Pearson, R., Cobon, G.S., Willadsen, P., 1994. A protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *Journal of Immunology* 153 (11), 5158–5166.
- Riek, R.F., 1957. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks I. Tick anaemia. *Australia Journal of Agriculture Research* 8, 209–214.
- Roberts, H.R., Hoffman, M., Monroe, D.M., 2006. A cell-based model of thrombin generation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 32, 32–38.
- Samish, M., 2000. Biocontrol of ticks. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916, 172–178.
- Simmonds, R.E., Lane, D.A., 1998. Regulation of Coagulation. In: Loscalzo, J., Schafer, A.I. (Eds.), *Thrombosis and Hemorrhage*, second ed. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 45–76.
- Sonenshine, D.E., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2006. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends in Parasitology* 22, 550–551.
- Spillert, C.R., Lazaro, E.J., 1993. Modified recalcification time: a global coagulation screening test. *Journal of the National Medical Association* 85, 611–616.
- Stone, B.F., 1963. Pathogenesis in the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Nature* 200, 1233.
- Tatchell, R.J., Bennett, G.F., 1969. *Boophilus microplus*: antihistaminic and tranquilizing drugs and cattle resistance. *Experimental Parasitology* 26 (3), 369–377.
- Turni, C., Lee, R.P., Jackson, L.A., 2002. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. *Parasite Immunology* 24, 355–361.
- Valladares, J.E., de Gopegui, R.R., Riera, C., Alberola, J., Gállego, M., Espada, Y., Portús, M., Arboix, M., 1998. Study of hemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Research in Veterinary Science* 64, 195–198.
- Veldman, A., Hoffman, M., Ehrenforth, S., 2003. New insights into the coagulation system and implications for new therapeutic options with recombinant Factor VIIa. *Current Medicinal Chemistry* 10, 797–811.
- Yarovaya, G.A., Blokhina, T.B., Neshkova, E.A., 2002. Contact system: new concepts on activation mechanisms and bioregulatory functions. *Biokhimiya* 67, 13–24.
- Wikel, S.K., Ramachandra, R.N., Bergman, D.K., 1994. Tick-induced modulation of the host immune response. *International Journal of Parasitology* 24, 59–66.
- Wikel, S.K., Ramachandra, R.N., Bergman, D.K., 1996. Arthropod Modulation of Host Immune Responses. In: Wikel, S.K. (Ed.), *The immunology of host-ectoparasitic arthropod relationships*. CAB International, Wallingford, pp. 107–130.

### 3.1. Parte II

*Pharmacological action of tick saliva upon haemostasis and the neutralization ability of sera from repeatedly infested hosts*

Artigo científico publicado no periódico *Parasitology*

(v. 136, p. 1339-1349, 2009)

Neste trabalho, exploram-se os mecanismos anti-hemostáticos da saliva carrapato *R. microplus*. Descreve-se, aqui, que além de realizar a inibição da coagulação, via inibição de trombina, a saliva do carrapato ainda é capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno, modular negativamente a ativação de células endoteliais e a consequente indução de fenótipo pró-coagulante e ainda apresenta atividade antitrombótica *in vivo*. Além disso, demonstra-se haver uma relação entre a resistência naturalmente adquirida contra o carrapato e a capacidade de neutralização dos anti-hemostáticos da saliva. Esta hipótese é baseada na observação feita neste trabalho de que o soro de animais repetidamente infestados pelo *R. microplus* e que apresentavam certa resistência ao parasito é capaz de interferir parcialmente na atividade anti-hemostática da saliva. A capacidade do soro de hospedeiros (repetidamente expostos a parasitos) em neutralizar componentes farmacologicamente ativos da saliva de hematófagos é relatada, pela primeira vez, neste trabalho. Ademais, a capacidade de inibir a conversão endotelial ao fenótipo pró-coagulante nunca fora descrita na saliva de animais hematófagos.

## Pharmacological action of tick saliva upon haemostasis and the neutralization ability of sera from repeatedly infested hosts

J. RECK Jr.<sup>1</sup>, M. BERGER<sup>1</sup>, F. S. MARKS<sup>2</sup>, R. B. ZINGALI<sup>3</sup>, C. W. CANAL<sup>2</sup>, C. A. S. FERREIRA<sup>4</sup>, J. A. GUIMARÃES<sup>1</sup> and C. TERMIGNONI<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre - RS - Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre - RS - Brazil

<sup>3</sup>Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro - RJ - Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre - RS - Brazil

<sup>5</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre - RS - Brazil

(Received 4 May 2009; revised 24 May 2009; accepted 26 May 2009; first published online 23 July 2009)

### SUMMARY

Ticks are blood-feeding arthropods widely distributed in the world and vectors of several diseases. As haematophagy demands evasion strategies and repeatedly infested hosts develop protective immune responses, we investigated the mechanisms of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva anti-haemostatic activity and the possible relationship between the acquired natural anti-tick host resistance and anti-haemostatic action. For this purpose, we studied the effects of *R. microplus* saliva on different pathways of haemostasis and tested whether repeated infested bovine sera (RIBS) are able to abolish salivary anti-haemostatic activities. *R. microplus* saliva (i) displays inhibitory activity upon collagen-induced platelet aggregation; (ii) inhibits the induction of endothelial pro-coagulant state; and (iii) reduces thrombogenesis *in vivo*. RIBS were shown to be able to partially block the delay of coagulation and the anti-thrombotic effect of saliva, and to totally abolish the modulation of endothelium activation. Conversely, RIBS has no effect on the inhibition of platelet aggregation. These results show, for the first time, the neutralization ability of sera from acquired resistance hosts against tick anti-haemostatics. Moreover, this is the first report of a haematophagous parasite able to modulate endothelial cell pro-coagulant state, and addresses the presence of anti-platelet and anti-thrombotic activity in *R. microplus* saliva.

Key words: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tick, haematophagous, haemostasis, coagulation, platelet, endothelium, thrombosis, bovine resistance.

### INTRODUCTION

Ticks are blood-feeding arthropods widely distributed in the world, which are able to parasitize humans as well as almost any domestic and wildlife vertebrate animals. In several countries, ticks are important public health hazards, since these arthropods are vectors of several bacterial, viral and protozoan tick-borne diseases (Walker, 1998).

Once a tick has found a host and reaches the attachment site, it introduces its mouthparts into the skin and induces vessel damage, which in turn triggers mechanisms to avoid blood loss and infection such as vasoconstriction, platelet aggregation,

coagulation, inflammation and migration of immune cells to the lesion site (Simmonds and Lane, 1998). Therefore, it could be stated that a successful bloodmeal depends on a fine balance between the pharmacological action of tick saliva and host responses. Thus, tick salivary secretion plays a major role in the modulation of host haemostatic and immunological responses (Ribeiro, 1989, 1995; Maritz-Olivier *et al.* 2007).

Several molecules with a large range of pharmacological properties have been characterized in tick saliva (for comprehensive reviews see Champagne and Valenzuela, 1996; Ribeiro and Francischetti, 2003; Francischetti *et al.* 2009). These molecules may act as vasodilators (Dickinson *et al.* 1976; Kemp *et al.* 1983), anti-platelets (Mans *et al.* 1998, 2002; Mans and Ribeiro, 2008), anti-coagulants (Horn *et al.* 2000; Francischetti *et al.* 2002, 2004; Ciprandi *et al.* 2006), immunosuppressants (Juncadella *et al.* 2007; Konnai *et al.* 2009) and anti-inflammatories (Kotsyfakis *et al.* 2006; Déruaz *et al.* 2008). Recently,

\* Corresponding author: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15005, ZIP Code 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55 51 33086082. Fax +55 51 33087309. E-mail: ctermignoni@cbiot.ufrgs.br.

we conducted an *in vivo* study reporting the systemic modulation of haemostasis from tick-naïve bovines infested with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Reck Jr *et al.* 2009). The study has shown that the consequences of the biological action of tick saliva to the host may be much more far-reaching than initially suspected, and that little is known about the full impact of these compounds to the tick-host relationship.

On the other hand, a well-known phenomenon occurs after repeated tick infestations: host acquisition of resistance (Wikel and Whelen, 1986), which seems to be mediated mainly by immune responses (Allen, 1994). Although this resistance status was widely studied and is mostly related to cellular immune responses, namely mediated by basophils and eosinophils, (Wikel *et al.* 1996), it also seems to depend on serum neutralization ability against several tick molecules, and the role of these tick compounds targeted by host serum requires further investigation.

The cattle tick *R. microplus*, formerly *Boophilus microplus* (Murrel and Barker, 2003), is the most harmful bovine parasite in Latin America and Australia (Jongejan and Uilenberg, 2004). *R. microplus* is also a consistent model to study the tick-host relationship, since it remains attached to the same host throughout the whole parasitic stage, which lasts around 3 weeks (Guimarães *et al.* 2001). Until now, thrombin inhibition was the only identified pathway of anti-haemostatic activity in *R. microplus*, since the anti-haemostatics reported for *R. microplus* were 2 thrombin inhibitors in saliva (Horn *et al.* 2000; Ciprandi *et al.* 2006), and 1 thrombin inhibitor in the gut (Ricci *et al.* 2007). Yet, no information has been made available about the pharmacological activity of *R. microplus* salivary compounds upon platelets, endothelium and *in vivo* models of thrombogenesis.

The aims of this work were to identify and to explore the pharmacological mechanisms of *R. microplus* saliva anti-haemostatic activity and to investigate a possible relationship between the acquired natural tick resistance and the anti-haemostatic action of this tick. For this purpose, we have studied the effects of *R. microplus* saliva on platelet aggregation, endothelial activation and thrombogenesis. We have also investigated whether sera from acquired natural tick resistance cattle were able to counteract the anti-haemostatic action of tick saliva.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Animals

Three male Hereford calves (*Bos taurus taurus*) of about 6 months of age from a tick-free area were utilized in this work. All procedures involving bovines were carried out in accordance with the

Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching (FASS, 1999). Male Wistar rats (weighing 350–400 g) and male New Zealand rabbits (3.5–4 kg) were also used in this work, and were housed in temperature-controlled (21–24 °C, in 12-h light/dark cycles) rooms. All animals had access to water and food *ad libitum*. All experiments performed in this work were carried out in accordance with local institutional ethical guidelines about animal experimentation, and all procedures were also in accordance with the instructions of the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) and NIH Animal Care Guidelines. Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

##### Drugs and reagents

Human plasma was obtained from 6 healthy male medication-free volunteers; bovine plasma was obtained from 3 tick-naïve male Hereford calves; all plasma samples were collected in 3.2% sodium citrate (1:10, v/v). Human thrombin was purified in our laboratory from plasma of healthy donors according to the method of Ngai and Chang (1991). Arachidonic acid was obtained and prepared following the instructions of manufacturer (Chrono-Log Co., Havertown, USA). Bovine collagen type I; adenosine diphosphate (ADP); bovine fibrinogen, lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 0111:B4, cell culture tested,  $\gamma$ -irradiated); and HAT media supplement (Hybri-Max™, lyophilized powder,  $\gamma$ -irradiated) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). All other culture media and additives were from Gibco Life Technologies (Gaithersburg, USA). Calcium thromboplastin (Soluplastin) was obtained from Wiener Lab (Rosario, Argentina). Sodium thiopental was purchased from Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, Brazil).

##### Infestation procedure and serum preparation

The tick-naïve bovines were infested with *R. microplus* larvae as described by Cruz and co-workers (2008). Briefly, 6 male *Bos taurus taurus* Hereford calves of about 6 months of age were purchased from an area naturally free of *R. microplus*. Infestations were performed with each calf being infested once a month for 12 months with *R. microplus* larvae of the Bagé strain along the back. Serum samples collected before the 1st infestation were called tick-naïve bovine sera (TNBS), and the serum samples collected after the 10th infestation were named as repeated infested bovine serum (RIBS). After 10 infestations, the bovines utilized to obtain RIBS displayed a significant decrease in the observed number of ticks that completed the parasitic cycle (Cruz *et al.* 2008).



### Tick saliva

Fully engorged *R. microplus* females that had spontaneously detached from the bovines were collected, rinsed, and induced to salivate with injection of 5  $\mu$ l pilocarpine (2%). Ticks were maintained in a humid chamber and saliva was collected for 2 h (approximately 1  $\mu$ l per tick). Saliva was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Saliva protein concentration was determined using the bicinchoninic acid method (BCA<sup>TM</sup> Protein Assay, Pierce, Rockford, USA) as previously described (Brown, 1989). Saliva quantities were expressed as  $\mu$ g or mg of protein. The saliva utilized in this work was collected only from engorged females which fed on bovines never exposed to ticks before.

### Coagulation assay

Plasma samples from tick-naïve bovines (100  $\mu$ l) were incubated for 15 min with phosphate-buffered saline (PBS) or tick saliva (5  $\mu$ l; 80  $\mu$ g/ml) previously incubated for 20 min with different volumes (15, 30, 60 and 90  $\mu$ l) of TNBS, RIBS, or PBS. Coagulation was measured by Recalcification Time (RT), performed as previously described (Ribeiro *et al.* 1995; Berger *et al.* 2008). The assay was conducted using a 96-well microplate spectrophotometer (SpectraMax, Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA) equipped with temperature and shaking controls. Results are the mean of 12 independent experiments.

### Platelets

The platelet function was measured by *in vitro* photometric method (Born and Cross, 1963), in an optical aggregometer (Chrono-Log Co., Havertown, USA). Blood samples were collected by puncture of marginal ear artery from male New Zealand rabbits using ACD solution as anticoagulant (2.5% trisodium citrate, 1.37% citric acid, 2% D-glucose; 1:5 v/v). Washed rabbit platelets (WRP) were obtained as follows. Blood was centrifuged 3 times at 200 *g* for 5 min to obtain platelet rich plasma (PRP). PRP was centrifuged at 650 *g* for 10 min. The supernatant was discarded and the platelet pellet was suspended in 300  $\mu$ l of ACD solution. Then, platelets were purified/washed following a protocol developed by Timmons and Hawinger (1989) consisting of gel filtration in a Sepharose-2B column equilibrated and eluted with Tyrode-albumin buffer, pH 7.4. Washed platelet suspensions were supplemented with 2 mM  $\text{CaCl}_2$  and 500  $\mu$ g/ml of fibrinogen. The platelet count was performed manually in a Neubauer chamber (haemocytometer) using optical microscopy and the platelet concentration was adjusted to 350 000 cells/ $\mu$ l. Aggregation was measured using the decrease rate in WRP (300  $\mu$ l) optical density (absorbance) in response to the addition of one of the

following agonist agents: adenosine diphosphate (ADP) (10  $\mu$ M), bovine collagen type I (40  $\mu$ g/ml), arachidonic acid (10  $\mu$ M), or human thrombin (2.5 U/ml). In order to verify whether *R. microplus* saliva was able to inhibit platelet aggregation, different concentrations of saliva were pre-incubated with platelets (for 15 min) before adding the agonist. For the experiments with serum, TNBS or RIBS were previously incubated (for 20 min) with *R. microplus* saliva before adding it to the platelet preparation. Results are the mean of 6 independent experiments.

### Cell culture

EAhy926 is a human derived endothelial cell line originated by fusing human umbilical vein endothelial cells with the permanent cell line of human lung carcinoma, A549 (Edgell *et al.* 1983). EAhy926 has been used as a model to study the endothelium, since it displays conserved functional characteristics of an endothelial cell (Edgell *et al.* 1983). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS), penicillin/streptomycin (200 units/ml and 200  $\mu$ g/ml, respectively), and supplemented with 100  $\mu$ M hypoxanthine, 0.4  $\mu$ M aminopterin, and 16  $\mu$ M thymidine (HAT media supplement), at  $37^{\circ}\text{C}$  in an incubator with humidified atmosphere of air/ $\text{CO}_2$  (95%/5%). As previously described, this cell line no requires additional growth factors (Edgell *et al.* 1983).

### Cell surface-pro-coagulant assay

Pro-coagulant activity was measured on the surface of endothelial cell monolayers (EAhy926) using a 96-well microplate spectrophotometer (SpectraMax<sup>®</sup>, Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA), based on the modified one-stage clotting assay (Visseren *et al.* 2000), as follows. EAhy926 cells cultured in DMEM (3% FCS) were seeded on 96-well microplates at a density of 40 000 cells/well and, after 24 h, different treatments were performed ( $\approx 80\%$  confluence). Cells were divided into 4 groups (6 wells per group) and received the following treatments (a final volume of 150  $\mu$ l was completed with DMEM): (i) 30  $\mu$ l of PBS; (ii) saliva (5  $\mu$ l; 40  $\mu$ g/ml)+25  $\mu$ l of PBS; (iii) saliva (40  $\mu$ g/ml)+25  $\mu$ l of RIBS; or (iv) saliva (40  $\mu$ g/ml)+25  $\mu$ l of TNBS. After 48 h all groups received 150  $\mu$ g/ml of LPS to induce endothelial activation. After 24 h, culture medium was totally removed and cells were washed 3 times with PBS. Monolayers were incubated with 100  $\mu$ l of Michaelis buffer (sodium-acetate 28.5 mM, sodium-barbital 28.5 mM, NaCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  33 mM, pH 7.35) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 60 s, after which 100  $\mu$ l of human pooled citrated plasma was added. The endothelial

induced-plasma clotting was measured in a spectrophotometer. The value obtained for PBS-treated group (control) was considered as having 100% pro-coagulant activity. Results are the mean of 8 independent experiments. Additional experiments ( $n=3$ ), using neutral red based cytotoxicity assay (TOX-4<sup>®</sup> *in vitro* toxicology assay kit, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), were performed to evaluate the cell viability after the different treatments.

*In vivo model of deep venous thrombosis*

For the determination of anti-thrombotic saliva activity, a rat thrombosis model was performed. The model is a combination of stasis and hypercoagulability induced by the injection of an exogenous tissue factor-rich component, as previously described (Vogel *et al.* 1989; Nazareth *et al.* 2006) with minor modifications. Wistar rats were anaesthetized with sodium thiopental (85 mg/kg, i.p.). Body temperature was monitored by a rectal thermometer and maintained at  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  using a thermal surgical table, as previously established (Bohrer *et al.* 2007). A laparotomy was performed, and the caudal vena cava was carefully dissected from surrounding tissues. Rats received the following treatments *via* the left femoral vein (final volume of 0.7 ml was completed with PBS): (i) PBS; (ii) saliva (0.7 mg/kg of rat body weight); (iii) saliva (0.7 mg/kg of rat body weight) and 500  $\mu\text{l}$  of TNBS; or (iv) saliva (0.7 mg/kg of rat body weight) and 500  $\mu\text{l}$  of RIBS. After 5 min, calcium thromboplastin (3 mg/kg body weight) was injected in the vena cava (near to the right renal vein) and stasis was immediately established by the ligation of caudal vena cava (above the insertion point of the right renal vein). The distal ligations of the vena cava (above the common iliac veins confluence), left renal vein and other major tributaries were conducted exactly 20 min after thromboplastin administration. The isolated segment of the caudal vena cava was removed and carefully opened. The thrombus was separated from the isolated segment, rinsed with 0.9% NaCl (at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and dried on a filter paper at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (1 h), and weighed. The ratio value of thrombus:rat weight was used in the comparisons. Results are the mean of 8 independent experiments.

*Statistical analysis*

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of  $n$  animals. Statistical significance was analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni *post hoc* test correction. A  $p$  value of less than 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) software.

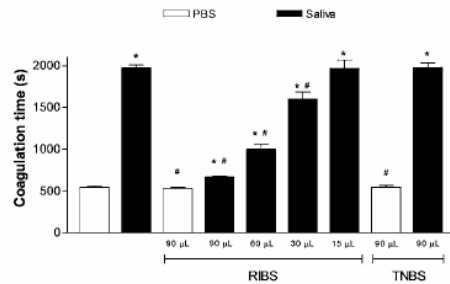


Fig. 1. Effects of repeatedly infested bovine sera (RIBS) on anti-coagulant activity of *Rhipicephalus microplus* saliva. The anti-coagulant action of saliva was measured by Recalcification Time (RT). The neutralization ability of sera from repeatedly infested cattle upon salivary anti-coagulation was also analysed. Saliva (80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was previously incubated with PBS, tick-naïve bovine sera (TNBS), or RIBS, as indicated, and then added to plasma samples to determine coagulation time. The volume ( $\mu\text{l}$ ) of incubated PBS, TNBS or RIBS is also indicated. (\*Statistical difference compared with group PBS + plasma, #statistical difference compared with group PBS + plasma + saliva,  $P < 0.05$ ).

RESULTS

*Coagulation*

*R. microplus* saliva significantly increased Recalcification Time (RT). When saliva (80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was pre-incubated with 100  $\mu\text{l}$  of bovine plasma for 15 min, RT increased by almost 4 times, as compared with the control (Fig. 1). This anti-coagulant effect was almost totally neutralized when saliva was previously incubated (for 20 min) with 90  $\mu\text{l}$  of repeated infested bovine sera (RIBS) before addition to the plasma in the RT assay (Fig. 1). This phenomenon seems to be dose-dependent, since the ability to block the anti-coagulant effect was directly related to serum quantity in the assay (Fig. 1). Experiments performed ( $n=3$ ) with higher amounts of RIBS (200  $\mu\text{l}$ ) led to the same result observed for 90  $\mu\text{l}$  (data not shown). In contrast, the tick-naïve bovine sera (TNBS) were not able to block the anti-coagulant effects of saliva (Fig. 1).

*Endothelial cell modulation*

In order to investigate whether *R. microplus* could impair haemostasis not only by inhibition of humoral factors but also by acting *via* endothelium, the ability of *R. microplus* saliva to negatively modulate endothelial activation was evaluated. For this purpose, a model of endothelial activation induced by LPS was employed. Cell activation was detected as a change in cell surface pro-coagulant activity. Endothelial cells (40000 cells) previously incubated for 48 h with

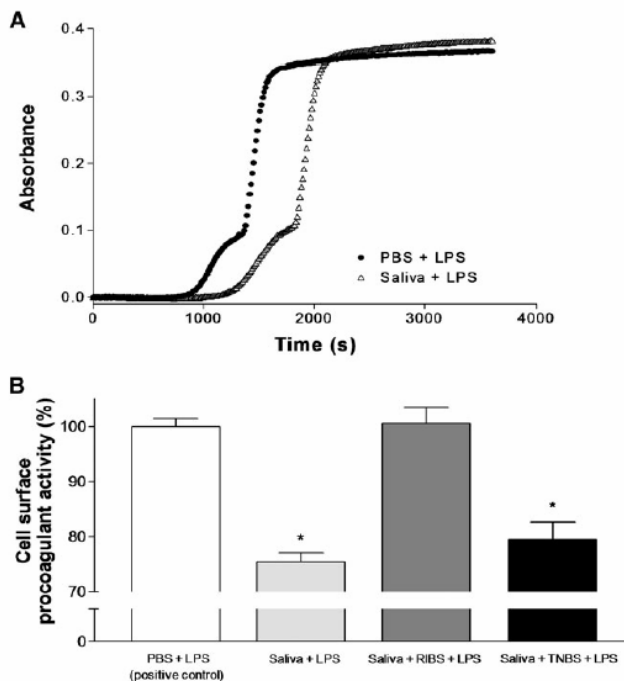


Fig. 2. Effects of *Rhipicephalus microplus* saliva and repeatedly infested bovine sera (RIBS)-treated saliva on the modulation of endothelial cell activation. The action of saliva on endothelial activation was analysed by cell surface-procoagulant assay. The neutralization ability of sera from repeated infested cattle upon salivary activities on endothelium was also analysed. (A) Representative register of the decrease in cellular pro-coagulant activity of EAhy926 monolayer pre-treated with saliva (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $\Delta$ ) compared with the control (cells pre-treated with PBS,  $\bullet$ ) after endothelial activation induced by LPS (150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). (B) Pro-coagulant activity of LPS-activated EAhy926 cells previously treated with PBS (positive control), saliva (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + PBS (25  $\mu\text{l}$ ), saliva (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + RIBS (25  $\mu\text{l}$ ), or saliva (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + TNBS (25  $\mu\text{l}$ ). (\*Statistical difference compared with positive control group,  $P < 0.05$ ).

*R. microplus* saliva (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and activated with LPS (150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 24 h) exhibited reduced pro-coagulant surface activity as compared to the control (incubated with PBS) (Fig. 2A). Under the conditions used, this effect does not seem to be dose dependent, since a higher saliva concentration (80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) induced the same effect as that caused by 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of saliva (data not shown). Similarly, lower saliva concentrations (10 and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were not able to induce significant changes in pro-coagulant activity (data not shown). A previous incubation of *R. microplus* saliva (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) with RIBS (50  $\mu\text{l}$ ) led to a complete blockade of endothelial modulation by saliva, since the cells displayed the same pro-coagulant profile of the control (previously incubated only with PBS) (Fig. 2B). Results from saliva previously incubated with the TNBS showed the same endothelial activation profile as those treated only with saliva (Fig. 2B). None of the treatments

performed induced any significant differences in endothelial cell viability (data not shown).

#### In vivo thrombosis model

Considering that *R. microplus* saliva was able to inhibit coagulation and endothelial cell activation, these anti-haemostatic mechanisms were investigated *in vivo* using the rat model of deep venous thrombosis, which includes all haemostatic pathways. It was shown that *R. microplus* saliva (0.7 mg/kg of rat body weight) is able to significantly reduce the ratio thrombus:rat weight to about 40% of the control value (Fig. 3). Moreover, pre-incubation of saliva (0.7 mg/kg) with 500  $\mu\text{l}$  of RIBS led to a partial reversion of anti-thrombotic activity, since the ratio thrombus/rat weight was recovered to about 80% of the control value (Fig. 3). Experiments performed ( $n=3$ ) with higher amounts of RIBS

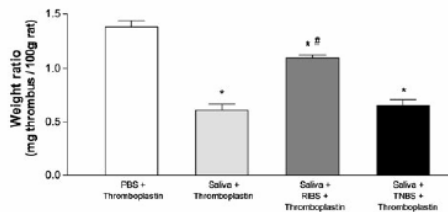


Fig. 3. Effects of *Rhipicephalus microplus* saliva and repeatedly infested bovine sera (RIBS)-treated saliva on thrombogenesis. The anti-thrombotic activity of saliva was measured by use of an *in vivo* model of rat deep venous thrombosis. The neutralization ability of sera from repeatedly infested cattle upon salivary anti-thrombotic action was also analysed. The treatments given to the rats were (i) PBS; (ii) saliva (0.7 mg/kg of rat body weight) and PBS; (iii) saliva (0.7 mg/kg) and 500  $\mu$ l of TNBS; or (iv) saliva (0.7 mg/kg) and 500  $\mu$ l of RIBS. The different treatments were administered (*i.v.*) 5 min before induction of thrombosis by thromboplastin (3 mg/kg rat body weight) and stasis, as described in the Materials and Methods section. (\*Statistical difference compared with group PBS + thromboplastin, #statistical difference compared with group saliva + thromboplastin,  $P < 0.05$ ).

(700 and 1000  $\mu$ l) led to the same result as observed for 500  $\mu$ l (data not shown). TNBS did not reverse the anti-thrombotic action of *R. microplus* saliva (Fig. 3).

#### Platelet aggregation

Platelet aggregation studies were performed in an optical aggregometer using washed rabbit platelets (WRP) and thrombin, collagen, arachidonic acid and ADP as agonists. Firstly, experiments were performed in order to investigate whether *R. microplus* salivary secretion was able to inhibit platelet aggregation. For this purpose, different concentrations of saliva were incubated with WRP for 15 min (at 37 °C). Then, agonist was added and the change in absorbance was immediately recorded. No inhibition was observed for platelet aggregation induced by thrombin, arachidonic acid or ADP after pre-incubation of WRP with *R. microplus* saliva, even at a high saliva concentration (420  $\mu$ g/ml) (data not shown). However, *R. microplus* saliva displayed inhibitory activity upon collagen-induced platelet aggregation, which was totally inhibited at the concentration of 200  $\mu$ g/ml of saliva (Fig. 4A). This inhibition occurred in a dose-dependent fashion, with an  $IC_{50}$  of 53  $\mu$ g/ml of saliva (Fig. 4B). It is interesting to note that, although RIBS induced a significant blockade of anti-coagulant, endothelium modulation and anti-thrombotic properties of *R. microplus* saliva, no interference in platelet aggregation inhibition induced by saliva was observed,

even after incubation in the presence of high quantities of RIBS (150  $\mu$ l/150  $\mu$ l of WRP) (data not shown).

#### DISCUSSION

Ticks are blood-feeding animals that require mechanisms to modulate host defence against parasitism, such as vasoconstriction, haemostasis, inflammation, pain, and innate and adaptive immune responses (Maritz-Olivier *et al.* 2007; Francischetti *et al.* 2009). Despite the powerful tick evasion mechanisms, after repeated tick infestations vertebrate hosts may develop some degree of resistance to the parasite (Wikel, 1996a; Brossard and Wikel, 2004). Nevertheless, it occurs mainly in situations of repeated high parasite load. Acquired resistance to tick infestation is expressed as a decrease in engorgement weight, increased time of feeding, impaired egg production and viability, inhibition of moult as well as death of ticks (Wikel, 1982, 1996b). Although the host-tick relationship is one of the most extensively studied host-parasite associations, the knowledge about host reactivity, tick resistance and saliva modulators is not enough to afford a complete understanding of this process.

In this work, anti-haemostatic mechanisms of *R. microplus* saliva and the humoral response within anti-tick natural acquired resistance were investigated. According to a previous report (Horn *et al.* 2000), it was shown that *R. microplus* saliva was able to induce a significant increase (about 4 times) in plasma coagulation time measured in the RT assay. This saliva activity was imputed to the action of the thrombin inhibitors, BmAP (Horn *et al.* 2000) and microphilin (Ciprandi *et al.* 2006). Figure 1 shows that repeatedly infested bovine sera (RIBS) were able to significantly decrease the anti-coagulant effects of saliva in a dose-dependent fashion. Although there was a marked reduction in the saliva effect, a complete reversion of anti-coagulant effect was not observed. The blockade of salivary anti-coagulant activity clearly indicates that there are neutralizing molecules in RIBS, not present in TNBS, acting upon the salivary anti-coagulants, probably antibodies, since these anti-coagulants are secreted in the saliva and inoculated into the host. Analogously, a study by Prevot and co-workers (2007) reported the ability of repeatedly infested rabbit serum to neutralize the enzymatic inhibitory activity of *Ixodes ricinus* salivary serpin. This kind of serum neutralization assay, although frequently reported against biological action of microbial diseases (Rutter *et al.* 1975; Johnson *et al.* 1995), was poorly reported for ectoparasites.

Although the effects of *R. microplus* saliva upon coagulation are well known (Horn *et al.* 2000; Ciprandi *et al.* 2006), other possible anti-haemostatic mechanisms have not yet been fully characterized,

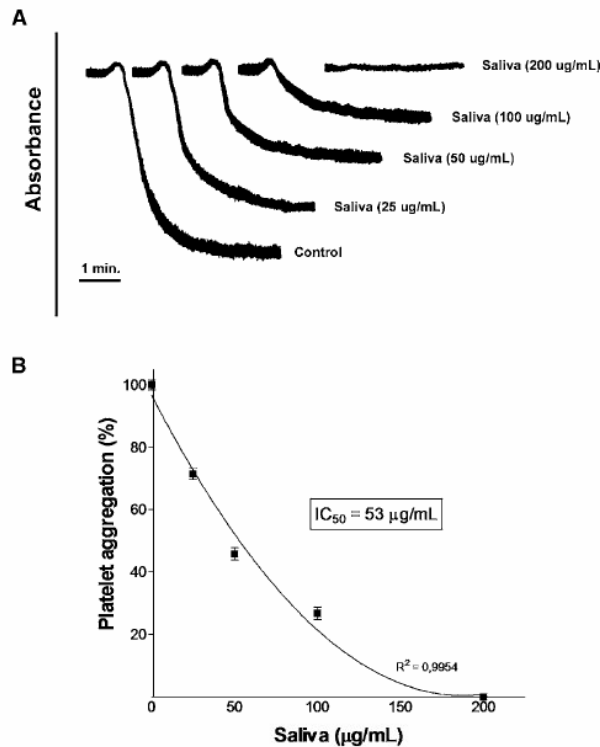


Fig. 4. Effects of *Rhipicephalus microplus* saliva on collagen-induced platelet aggregation. The inhibitory activity of crescent concentrations of *R. microplus* saliva (25, 50, 100 or 200 µg/ml) upon WRP aggregation induced by collagen (3 µM) was measured. (A) Representative profile of collagen induced-platelet aggregation of WRP previously incubated with *R. microplus* saliva. (B) Each point represents the mean from 6 independent experiments, and vertical lines indicate the S.E.M.

leaving significant gaps concerning the role saliva molecules play in other haemostatic events, such as platelet aggregation, endothelial response, and thrombogenesis. The data presented here clearly show that *R. microplus* saliva exerts a significant effect upon the endothelium. Figure 2A demonstrates that saliva is able to reduce the endothelial procoagulant activity induced by LPS due to a direct effect of saliva upon endothelial cells, probably *via* an alteration in protein surface composition and/or induced gene expression (Makrides and Ryan, 1998). Endothelial activation is a complex process which includes a reversion in the cell phenotype, changing from an anti-thrombotic state to a pro-thrombotic state in response to several stimuli, like cellular lesion, bacterial and viral infection, peptide signalling, or chemical damage (Gibbons, 1998). Modulation of endothelial cells by tick saliva seems to be an alternative pathway to control host defences independently of humoral mechanisms, which could allow the parasite to regulate haemostasis, inflammation,

immunity and lesion cicatrization. Maxwell and co-workers (2005) have demonstrated that salivary gland extracts of *Dermacentor andersoni* significantly down-regulated the expression of inflammatory molecules, such as ICAM-1. They have also reported that salivary gland extracts of *I. scapularis* reduced the expression of different adhesion-molecules, such as selectins and VCAM-1. Francischetti and co-workers (2005) have reported the potent anti-angiogenic and anti-proliferative activities of *I. scapularis* saliva upon endothelial cells, introducing the novel notion that tick saliva is a negative modulator of wound healing and tissue repair. Despite these two very elegant reports about tick saliva and salivary gland action on the biology of endothelial cells, the modulation of the haemostatic properties of the endothelium by ticks has never been reported before. A lingering doubt surrounds the ability of other ticks, specially two and three host-ticks, to modulate the haemostatic properties of the endothelium in a similar fashion.

It is interesting to note that when saliva was pre-incubated with RIBS, the salivary modulatory effects upon endothelium were totally blocked, differently from that which occurs with coagulation, where the serum blocking effect was only partial. Thus, host neutralization ability seems to be more powerful for the salivary molecules responsible for the modulation of endothelium than for coagulation. Despite the fact that cell modulation by ticks is possibly triggered by several molecules with synergistic action – or by a cocktail of compounds (Wikel *et al.* 1996) – it seems that infestation induces the production of different neutralizing antibodies able to block this seemingly multifactorial effect.

The occurrence of haemostatic disturbances in tick-infested calves indicates that *R. microplus* saliva is able to modulate haemostasis *in vivo* (Reck Jr *et al.* 2009), and it strongly suggests the presence of *in vivo* anti-thrombotic activity. In order to evaluate the anti-haemostatic properties of saliva in a model that reproduces all pathways involved in haemostasis, we investigated the anti-thrombotic ability of tick saliva using the *in vivo* model of rat deep venous thrombosis. Although other ticks display salivary anti-thrombotic properties (Fioravanti *et al.* 1993; Nazareth *et al.* 2006) and despite the fact that the *in vitro* anti-coagulant effects of *R. microplus* saliva are well known, the anti-thrombotic activity of *R. microplus* saliva has never been reported before. Here we have shown that *R. microplus* saliva clearly modulates thrombogenesis, and that RIBS were able to induce a significant decrease in saliva anti-thrombotic activity. This reduction, however, does not promote a complete recovery of the thrombotic activity, since the group treated with RIBS significantly differs in comparison with both the control group (treated only with thromboplastin) and the saliva-treated group. The residual anti-thrombotic activity of saliva was probably due to the fact that RIBS neutralization activity seems to be different in the three haemostatic pathways studied here, since RIBS are able to totally neutralize the action of tick saliva upon endothelium and to nearly block the effect of salivary anti-coagulant, although it has no neutralizing activity upon platelet aggregation inhibition. Taking into account the variety of compounds that participate in the thrombogenesis *in vivo*, the anti-thrombotic effect exerted by *R. microplus* saliva probably implies a wide arsenal of molecules that, as regards immune evasion mechanisms, tend to avoid the recognition of the epitopes necessary to completely neutralize the overall effect. In fact, a full blockage of all activities involved in anti-thrombosis would probably result in suppression of blood feeding. But in fact this does not occur, since some ticks remain attached to the resistant host and succeed to complete their parasitic cycle, though with a marked reduction in number and viability of parasites (Wikel, 1982; Cruz *et al.* 2008).

Since several ticks and other haematophagous arthropods display platelet antagonists as one of their anti-haemostatic resources, the occurrence of platelet aggregation inhibitors in *R. microplus* was investigated. The present study reports, for the first time, that *R. microplus* saliva is able to inhibit the collagen-induced platelet aggregation in WRP. This inhibition could be related to the collagen-binding component reported in the salivary glands of *R. microplus* (Ferreira *et al.* 2002). Collagen-induced platelet aggregation may occur through two distinct pathways, directly *via* activation of phospholipase C or *via* arachidonic acid pathway or indirectly *via* ADP release from cell granules. The fact that *R. microplus* saliva does not inhibit arachidonic acid-induced platelet aggregation indicates this tick uses a distinct mechanism to inhibit collagen-induced platelet aggregation, as compared to *Ornithodoros moubata* (Mans and Ribeiro, 2008). Surprisingly, no saliva inhibition was observed in platelet response to thrombin, arachidonic acid or ADP (data not shown), in spite of the fact that *R. microplus* possesses two thrombin inhibitors in saliva. The lack of inhibition in thrombin-induced platelet aggregation could be due to an insufficient concentration reached by the salivary thrombin inhibitors in the saliva preparations utilized, leading to an unfeasible inhibition only because the inhibitor concentration is not high enough to suppress thrombin activity. This hypothesis is corroborated by comparing the saliva concentration used in the experiment with the  $K_i$  of microphilin, which is in the micromolar range (Ciprandi *et al.* 2006). Indeed, this result seems to contradict a previous report, since microphilin, an *R. microplus* thrombin inhibitor, inhibits fibrinocoagulation and thrombin-induced platelet aggregation (Ciprandi *et al.* 2006). However, besides microphilin  $K_i$ , this contrasting finding could be explained by analytical differences between the studies, since we performed the incubation of saliva with the platelets and added the agonist after a time interval (thrombin, collagen, arachidonic acid or ADP), while Ciprandi and co-workers (2006) performed the incubation of saliva with thrombin and added the mixture to platelets after a time interval. The approach employed by Ciprandi and co-workers (2006) was designed to characterize the effects of thrombin inhibition by microphilin binding.

It is interesting to note that among all activities investigated, the inhibition of platelet aggregation is the only one in which the RIBS used were not able to interfere (data not shown), which suggests that the salivary anti-platelet molecule(s) has (have) low immunogenicity and is probably due to the naturally acquired resistance to ticks in the bovines used. However, this does not imply that the platelet aggregation inhibitor should be dismissed as an unfeasible resource for the development of an anti-tick vaccine. In this sense, Kotsyfakis and co-workers

(2008) conducted an efficient study that introduced a new concept in the tick-host relationship—the silent antigens—like sialostatin L2. This molecule was found in *I. scapularis* saliva and was not recognized by sera of guinea pigs repeatedly exposed to ticks; yet, when sialostatin L2 was used as a vaccine antigen, the serum of vaccinated animals recognized the protein and the immunization procedure lent protection to the hosts (Kotsyfakis *et al.* 2008).

Despite the widely accepted notion that tick saliva is largely non-immunogenic, our study suggests that anti-coagulants, endothelial modulators and anti-thrombotic molecules are immunogenic and could be used as vaccinal antigens to reproduce the resistance status of repeatedly infested bovines, which would be accomplished through a vaccination strategy, and possibly reinforced by natural infestations. However, our results were obtained with non-diluted sera, indicating that this immunogenicity is not as high as that obtained by highly immunogenic antigens, as concealed antigens. Accordingly, our data indicate that the molecules involved in anti-haemostasis may be candidates to compose a cocktail vaccine, possibly in a strategy associating concealed and silent antigens.

Studies evaluating the relative importance of an adaptative humoral response in bovine resistance against *R. microplus* presented conflicting results. The levels of anti-*R. microplus* antibodies were not positively correlated with resistance in some analyses (Johnston *et al.* 1986; Kimaro and Opdebeeck, 1994; Jackson and Opdebeeck, 1995), but were positively correlated in others, either originated from vaccination (Willadsen, 1987; Willadsen *et al.* 1995) or repeated infestations (Cruz *et al.* 2008). Here we show that sera from resistant bovines, although presenting low titres of anti-tick antibodies (Cruz *et al.* 2008), were able to impair anti-haemostatic tick saliva activities. These results suggest that global levels of anti-tick antibodies are not undoubtedly indicative of host resistance. Since levels of antibodies are modulated by tick infestation (Cruz *et al.* 2008), antibodies induced by high-density infestations could be predominantly targeted to unessential and/or a fraction of functionally redundant molecules.

Although the biochemical and immunological basis of anti-haemostatic mechanisms of ticks (Ribeiro, 1995; Ribeiro and Francischetti, 2003; Maritz-Olivier *et al.* 2007; Francischetti *et al.* 2009) and the natural acquired resistance (Wikel, 1996*a, b*) have been widely studied, reports concerning the possible relationship between these two phenomena are scarce. The present work shows, for the first time, the occurrence of neutralizing activity against the salivary anti-haemostatics of ticks in sera of repeatedly infested hosts that exhibit natural acquired resistance. Also, this study is the first to report a haematophagous parasite modulating the endothelial

cell pro-coagulant state, and shows the presence of platelet aggregation inhibitory and anti-thrombotic action in *R. microplus* saliva.

Finally, since acquired resistance and successful parasitism seem to depend on a state of balance between host defences and tick modulators (Wikel, 1996*a*), this study allows a better understanding of the relationship between the acquired natural tick resistance and the anti-haemostatic action and gives more insights to elucidate mechanisms related with the tick-host interaction.

We are indebted to the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support. Special thanks to Dr Lucélia Santi, Dr Renata Terra and Dr Antônio Pinto (Centro de Biotecnologia, UFRGS) for their assistance in the execution of this work, to Ana Cruz (PUCRS) and Professor Sérgio Silva (Faculdade de Veterinária, UFPel) for kindly providing of cattle serum samples, to Professor Fabiana Horn (Departamento de Biofísica, UFRGS) for critical review of this manuscript and for kindly providing endothelial cells, and to Dr Cora-Jean Edgell (Department of Pathology, University of North Carolina) for the permission to use EAhy926 cells.

## REFERENCES

- Allen, J. R. (1994). Host resistance to ectoparasites. *Revue Scientifique et Technique – Office International des Epizooties* **13**, 1287–1303.
- Berger, M., Pinto, A. F. and Guimarães, J. A. (2008). Purification and functional characterization of bothrojarivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* **51**, 488–501.
- Bohrer, C. B., Reck, J. J., Fernandes, D., Sordi, R., Guimarães, J. A., Assreuy, J. and Termignoni, C. (2007). Kallikrein kinin system activation by *Lonomia obliqua* caterpillar bristles: Involvement in edema and hypotension responses to envenomation. *Toxicon* **49**, 663–669.
- Born, G. V. R. and Cross, M. J. (1963). The aggregation of blood platelets. *Journal of Physiology* **168**, 178–195.
- Brossard, M. and Wikel, S. K. (2004). Tick immunobiology. *Parasitology* **129** (Suppl.), S161–S176.
- Brown, R. E. (1989). Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical Biochemistry* **180**, 136–139.
- Champagne, D. E. and Valenzuela, J. G. (1996). Pharmacology of haematophagous arthropod saliva. In *The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships* (ed. Wikel, S. K.), pp. 85–106. CAB International, Wallingford, UK.
- Ciprandi, A., Oliveira, S. K., Masuda, A., Horn, F. and Termignoni, C. (2006). *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental Parasitology* **114**, 40–46.
- Cruz, A. P., Silva, S. S., Mattos, R. T., Da Silva Vaz, I., Jr., Masuda, A. and Ferreira, C. A. (2008). Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. *Veterinary Parasitology* **158**, 152–158.

- Déruaz, M., Frauensschuh, A., Alessandri, A. L., Dias, J. M., Coelho, F. M., Russo, R. C., Ferreira, B. R., Graham, G. J., Shaw, J. P., Wells, T. N., Teixeira, M. M., Power, C. A. and Proudfoot, A. E. (2008). Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with anti-inflammatory activity. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 2019–2031.
- Dickinson, R. G., O'Hagan, J. E., Schotz, M., Binnington, K. C. and Hegarty, M. P. (1976). Prostaglandin in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* **54**, 475–486.
- Edgell, C. J., McDonald, C. C. and Graham, J. B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **80**, 3734–3737.
- FASS. (1999). *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*. 1st Edn. Federation of Animal Science Societies, Savoy, USA.
- Ferreira, C. A., Da Silva Vaz, I., Silva, S. S., Haag, K. L., Valenzuela, J. G. and Masuda, A. (2002). Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Experimental Parasitology* **101**, 25–34.
- Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., Andersen, J. F., Mather, T. N. and Ribeiro, J. M. (2002). 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. *Blood* **99**, 3602–3612.
- Francischetti, I. M., Mather, T. N. and Ribeiro, J. M. (2004). Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thrombosis and Haemostasis* **91**, 886–898.
- Francischetti, I. M. B., Mather, T. N. and Ribeiro, J. M. C. (2005). Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis* **94**, 167–174.
- Francischetti, I. M., Sa-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M. and Ribeiro, J. M. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience* **14**, 2051–2088.
- Fioravanti, C., Burkholder, D., Francis, B., Siegl, P. K. and Gibson, R. E. (1993). Antithrombotic activity of recombinant tick anticoagulant peptide and heparin in a rabbit model of venous thrombosis. *Thrombosis Research* **71**, 317–324.
- Gibbons, G. H. (1998). The vascular response to injury. In *Thrombosis and Hemorrhage* (ed. Loscalzo, J. and Schafer, A. I.), pp. 307–320, 2nd Edn. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Guimarães, J. H., Tucci, E. C. and Barros-Battesti, D. M. (2001). *Ectoparasitos de Importância Veterinária*. 1st Edn. Editora Pleiade, São Paulo, Brazil.
- Horn, F., Santos, P. C. and Termignoni, C. (2000). *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **384**, 68–73.
- Jackson, L. A. and Opdebeeck, J. P. (1995). The effect of various adjuvants on the humoral immune response of sheep and cattle to soluble and membrane midgut antigens of *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* **58**, 129–141.
- Johnson, S., Sypura, W. D., Gerding, D. N., Ewing, S. L. and Janoff, E. N. (1995). Selective neutralization of a bacterial enterotoxin by serum immunoglobulin A in response to mucosal disease. *Infection and Immunity* **63**, 3166–3173.
- Johnston, L. A., Kemp, D. H. and Pearson, R. D. (1986). Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology* **16**, 27–34.
- Jongejan, F. and Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* **129** (Suppl.), S3–S14.
- Juncadella, I. J., Garg, R., Ananthnarayanan, S. K., Yengo, C. M. and Anguita, J. (2007). T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **49**, 433–438.
- Kemp, D. H., Hales, J. R., Schleger, A. V. and Fawcett, A. A. (1983). Comparison of cutaneous hyperemia in cattle elicited by larvae of *Boophilus microplus* and by prostaglandins and other mediators. *Experientia* **39**, 725–727.
- Kimaro, E. E. and Opdebeeck, J. P. (1994). Tick infestations on cattle vaccinated with extracts from the eggs and the gut of *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* **52**, 61–70.
- Konnai, S., Nakajima, C., Imamura, S., Yamada, S., Nishikado, H., Kodama, M., Onuma, M. and Ohashi, K. (2009). Suppression of cell proliferation and cytokine expression by HL-p36, a tick salivary gland-derived protein of *Haemaphysalis longicornis*. *Immunology* **126**, 209–219.
- Kotsyfakis, M., Anderson, J. M., Andersen, J. F., Calvo, E., Francischetti, I. M., Mather, T. N., Valenzuela, J. G. and Ribeiro, J. M. (2008). Cutting edge: Immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *Journal of Immunology* **181**, 5209–5212.
- Kotsyfakis, M., Sa-Nunes, A., Francischetti, I. M., Mather, T. N., Andersen, J. F. and Ribeiro, J. M. (2006). Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 26298–26307.
- Makrides, S. C. and Ryan, U. S. (1998). Overview of the endothelium. In *Thrombosis and Hemorrhage* (ed. Loscalzo, J. and Schafer, A. I.), pp. 295–306, 2nd Edn. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Mans, B. J., Gaspar, A. R., Louw, A. I. and Neitz, A. W. (1998). Purification and characterization of apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Comparative Biochemistry and Physiology B – Biochemistry and Molecular Biology* **120**, 617–624.
- Mans, B. J., Louw, A. I. and Neitz, A. W. (2002). Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 21371–21378.
- Mans, B. J. and Ribeiro, J. M. (2008). Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 841–852.



- Maritz-Olivier, C., Stutzer, C., Jongejan, F., Neitz, A. W. and Gaspar, A. R. (2007). Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends in Parasitology* **23**, 397–407.
- Maxwell, S. S., Stoklasek, T. A., Dash, Y., Macaluso, K. R. and Wikel, S. K. (2005). Tick modulation of the in-vitro expression of adhesion molecules by skin-derived endothelial cells. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **99**, 661–672.
- Murrell, A. and Barker, S. C. (2003). Synonymy of *Boophilus* Curtrice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology* **56**, 169–172.
- Nazareth, R. A., Tomaz, L. S., Ortiz-Costa, S., Atella, G. C., Ribeiro, J. M., Francischetti, I. M. and Monteiro, R. Q. (2006). Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. *Thrombosis and Haemostasis* **96**, 7–13.
- Ngai, P. K. and Chang, J. Y. (1991). A novel one-step purification of human alpha-thrombin after direct activation of crude prothrombin enriched from plasma. *The Biochemical Journal* **280**, 805–808.
- Prevot, P. P., Couvreur, B., Denis, V., Brossard, M., Vanhamme, L. and Godfroid, E. (2007). Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine* **25**, 3284–3292.
- Reck, J., Jr., Berger, M., Terra, R. M. S., Marks, F. S., da Silva Vaz, I., Jr., Guimarães, J. A. and Termignoni, C. (2009). Effects of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation on the host hemostatic system. *Research in Veterinary Science* **86**, 56–62.
- Ribeiro, J. M. (1989). Role of saliva in tick/host interaction. *Experimental and Applied Acarology* **7**, 15–20.
- Ribeiro, J. M. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents and Diseases* **4**, 143–152.
- Ribeiro, J. M. and Francischetti, I. M. B. (2003). Role of arthropod saliva in blood-feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology* **48**, 73–88.
- Ribeiro, J. M., Schneider, M. and Guimarães, J. A. (1995). Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *The Biochemical Journal* **308**, 243–249.
- Ricci, C. G., Pinto, A. F. M., Berger, M. and Termignoni, C. (2007). A thrombin inhibitor from the gut of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* **42**, 291–300.
- Rutter, J. M., Jones, G. W., Brown, G. T., Burrows, M. R. and Luther, P. D. (1975). Antibacterial activity in colostrum and milk associated with protection of piglets against enteric disease caused by K88-positive *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **13**, 667–676.
- Simmonds, R. E. and Lane, D. A. (1998). Regulation of coagulation. In: *Thrombosis and Hemorrhage* (ed. Loscalzo, J. and Schafer, A. I.), pp. 45–76, 2nd Edn. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Steeves, E. B. and Allen, J. R. (1991). Tick resistance in mast cell-deficient mice: histological studies. *International Journal for Parasitology* **21**, 265–268.
- Timmons, S. and Hawiger, J. (1989). Isolation of human platelets by albumin gradient and gel filtration. *Methods in Enzymology* **169**, 11–21.
- Visseren, F. L., Bouwman, J. J., Bouter, K. P., Diepersloot, R. J., de Groot, P. H. and Erkelens, D. W. (2000). Procoagulant activity of endothelial cells after infection with respiratory viruses. *Thrombosis and Haemostasis* **84**, 319–324.
- Vogel, G. M., Meuleman, D. G., Bourgondiën, F. G. and Hobbelen, P. M. (1989). Comparison of two experimental thrombosis models in rats: effects of four glycosaminoglycans. *Thrombosis Research* **54**, 399–410.
- Walker, D. H. (1998). Tick-transmitted infectious diseases in the United States. *Annual Review of Public Health* **19**, 237–269.
- Wikel, S. K. (1982). Immune responses to arthropods and their products. *Annual Review of Entomology* **27**, 21–48.
- Wikel, S. K. (1996a). Immunology of the tick-host interface. In *The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships* (ed. Wikel, S. K.), pp. 204–231. CAB International, Wallingford, UK.
- Wikel, S. K. (1996b). Host immunity to ticks. *Annual Review of Entomology* **41**, 1–22.
- Wikel, S. K., Ramachandra, R. N. and Bergman, D. K. (1996). Arthropod modulation of host immune responses. In *The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships* (ed. Wikel, S. K.), pp. 107–130. CAB International, Wallingford, UK.
- Wikel, S. K. and Whelen, A. C. (1986). Ixodid-host immune interaction. Identification and characterization of relevant antigens and tick-induced host immunosuppression. *Veterinary Parasitology* **20**, 149–174.
- Willadsen, P. (1987). Immunological approaches to the control of ticks. *International Journal for Parasitology* **17**, 671–677.
- Willadsen, P., Bird, P., Cobon, G. S. and Hungerford, J. (1995). Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* **110** (Suppl.), S43–S50.

#### 4. DISCUSSÃO & CONCLUSÕES

O estudo da bioquímica dos artrópodos hematófagos pode fornecer dados importantes para o maior conhecimento dos mecanismos patogênicos associados ao parasitismo. Neste trabalho, exploraram-se as atividades biológicas da saliva do carrapato *R. microplus*, buscando sempre contextualizar estas atividades com o seu papel *in vivo*, na modulação das defesas do hospedeiro.

Na primeira parte deste estudo, a investigação dos parâmetros hemostáticos de bovinos infestados pelo *R. microplus* serviu de modelo para uma análise das alterações no hospedeiro parasitado por hematófagos. Esta abordagem foi proposta com base na seguinte hipótese: considerando o vasto arsenal farmacológico da saliva dos hematófagos, com ação sobre a hemostasia *in vitro* e provavelmente no local de fixação do carrapato, a infestação parasitária seria capaz de alterar/modular sistemicamente a resposta hemostática? Apesar de diversos trabalhos relatarem a potente ação anti-hemostática da saliva de animais hematófagos (CHAMPAGNE & VALENZUELA, 1996; RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003; FRANCISCHETTI et al. 2009), até então, a capacidade modulatória global sobre a hemostasia do hospedeiro parasitado nunca havia sido investigada. Os resultados obtidos neste trabalho indicam uma evidente alteração na hemostasia dos bovinos infestados pelo carrapato *R. microplus*. Este quadro é induzido, provavelmente, por dois mecanismos distintos: diretamente, em decorrência da ação da saliva inoculada no hospedeiro (hipoagregação plaquetária e diminuição na capacidade de coagulação do plasma); e, indiretamente, pelas respostas compensatórias do bovino (elevação do fibrinogênio e da plaquetemia). Esse tipo de efeito decorrente do parasitismo forneceu mais suporte à ideia, inicialmente associada apenas ao sistema imune, de que o parasitismo é um fenômeno de

repercussões sistêmicas e que altera, de diversas maneiras, as funções do organismo do indivíduo parasitado (WIKEL, 1996a).

Na segunda parte deste estudo, buscou-se identificar a relação entre dois tópicos determinantes no entendimento das relações parasito-hospedeiro: a ação da saliva e a resistência adquirida. Este trabalho é subdividido em duas partes, a primeira focando as atividades da saliva, e a segunda investigando o envolvimento dos componentes salivares com a resistência humoral. A abordagem utilizada neste estudo foi proposta com base nas seguintes hipóteses: (i) o *R. microplus* apresenta outros recursos anti-hemostáticos além da inibição de trombina? (ii) sabendo-se que o endotélio apresenta funções importantes na resposta hemostática e que outras espécies de carrapatos possuem potentes mediadores capazes de alterar certas propriedades biológicas (relacionadas à inflamação e angiogênese) das células endoteliais, o carrapato *R. microplus* é capaz de modular as propriedades hemostáticas do endotélio? (iii) visto a ocorrência de alterações nos parâmetros hemostáticos de animais infestados por *R. microplus*, a saliva deste carrapato é capaz de apresentar atividade antitrombótica *in vivo*? (iv) frente ao fato de carrapatos que se alimentam em bovinos, repetidamente infestados, apresentarem dificuldade de fixação e de ingurgitamento, devido, pelo menos em parte, ao fato de que o hospedeiro poderia ser capaz de bloquear a ação de moléculas farmacologicamente ativas do carrapato, o soro desses bovinos resistentes é capaz de neutralizar as ações anti-hemostáticas da saliva? Em caso afirmativo, a última hipótese ainda gera um questionamento teórico sobre se a neutralização dos anti-hemostáticos pode ser relacionada ao surgimento do fenômeno de resistência adquirida ao *R. microplus*.

Com efeito, nesta segunda parte do trabalho, demonstra-se que diferentes mecanismos anti-hemostáticos estão presentes na saliva de *R. microplus*. Em relação ao

endotélio, há uma crescente consolidação de seu papel como um participante ativo na resposta a lesões vasculares e em outros processos do organismo (BEHLING-KELLY & CZUPRYNSKI, 2007). Recentemente, diversos estudos têm demonstrado claramente que fenômenos de modulação positiva da ativação endotelial (induzindo um fenótipo pró-coagulante), como nos casos de infecções pelos agentes causadores da malária humana ou da circovirose suína, são um evento determinante na patogenia e na evolução clínica destas doenças (FRANCISCHETTI et al., 2007; MARKS et al., 2009). Por outro lado, a modulação negativa da ativação de fenótipos pró-coagulantes parece ser um acontecimento raro (BEHLING-KELLY & CZUPRYNSKI, 2007). Contudo, levando em consideração a atividade observada na saliva de *R. microplus*, esta modulação pode ser um recurso importante no caso de parasitismo por animais hematófagos. Já a verificação da capacidade antitrombótica da saliva, reforça a ideia de que os componentes salivares de hematófagos possuem potencial de futura aplicação clínica para modular fenômenos trombóticos (CHAMPAGNE, 2004). A demonstração da capacidade de neutralização do soro de animais repetidamente infestados pelo *R. microplus* sobre componentes salivares, reforça a ideia de que o bloqueio da ação da saliva contribui com o surgimento da resistência ao carrapato (SZABÓ, 2009). As diferenças na capacidade de neutralização frente a diferentes ações biológicas da saliva podem estar relacionadas à imunogenicidade do(s) composto(s) salivar(es) em questão.

Nesse sentido, estudos posteriores são necessários, identificando as moléculas responsáveis pelas atividades biológicas aqui descritas no intuito de compreender estas diferenças. A observação da ação neutralizante parcial do soro sobre os mecanismos antitrombóticos do carrapato sugere que, mesmo frente ao quadro de resistência, com a ocorrência de anticorpos contra componentes salivares, a inibição da hemostasia ainda pode

ser atingida. De fato, a hematofagia ainda é viável nestas situações, visto que alguns carrapatos completam seu ciclo de vida mesmo em animais resistentes (CRUZ et al., 2008).

O fenômeno do parasitismo pode ser definido como uma associação resultante da interação entre as estratégias de espoliação do parasito e os processos de homeostase, de defesa e de compensação do hospedeiro. Os resultados apresentados nestes trabalhos indicam o quão complexo são os mecanismos que regem a relação entre o carrapato e o bovino. Em linhas gerais, o carrapato possui uma larga gama de mediadores anti-hemostáticos que possibilitam sua fixação e hematofagia, que, por sua vez, exercem um efeito potente local e sistêmico no hospedeiro que utiliza mecanismos de defesa e processos compensatórios para combater o parasito. À medida que o contato do bovino com o parasito torna-se mais frequente, o organismo do hospedeiro apresenta-se mais preparado a responder ao carrapato, lançando mão, entre outros recursos, de uma capacidade de inibição dos componentes salivares que permitem a ocorrência da hematofagia. Neste contexto, o conjunto dos dados deste estudo fornece não somente novos subsídios, mas também gera novos questionamentos, os quais devem contribuir ao avanço da compreensão dos fatores que determinam à (não) manutenção do equilíbrio na relação parasito-hospedeiro.

## 5. REFERÊNCIAS

- AIRD, W. C., Endothelium as an organ system. **Crit. Care Med.**, 32: S271–S279, 2004.
- ALMEIDA, M. B.; TORTELLI, F. P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J. L. M.; SOARES, M. P.; FARIAS, N. A. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. **Pesq. Vet. Bras.**, 26(4): 237-242, 2006.
- ANDERSEN, J. F.; HINNEBUSCH, B. J.; LUCAS, D. A.; CONRADS, T. P.; VEENSTRA, T. D.; PHAM, V. M.; RIBEIRO, J. M. An insight into the sialome of the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis* (Rots). **BMC Genomics**, 16(8): 102, 2007.
- ANDERSON, J. M. & VALENZUELA, J. G. Tick saliva: from pharmacology and biochemistry to transcriptome analysis and functional genomics. In: Bowman, A. S. & Nutall, P. A. **Ticks – Biology, Disease and control**. Cambridge University Press, New York, p. 92-107, 2008.
- ARCÀ, B.; LOMBARDO, F.; FRANCISCHETTI, I. M.; PHAM, V. M.; MESTRES-SIMON, M.; ANDERSEN, J. F.; RIBEIRO JM. An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 37(2): 107-127, 2007.
- ARCÀ, B.; LOMBARDO, F.; VALENZUELA, J. G.; FRANCISCHETTI, I. M.; MARINOTTI, O.; COLUZZI, M.; RIBEIRO, J. M. An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles gambiae*. **J. Exp. Biol.**, 208(20): 3971-3986, 2005.
- ASSUMPÇÃO, T. C.; FRANCISCHETTI, I. M.; ANDERSEN, J. F.; SCHWARZ, A.; SANTANA, J. M.; RIBEIRO, J. M. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 38(2): 213-32, 2008.
- BALASHOV, Y. S. **Bloodsucking ticks (Ixodoidea) - vectors of diseases of man and animals**. Entomological Society of America Publications, College Park, 1972.
- BARRIGA, O. O.; DA SILVA, S. S.; AZEVEDO, J. S. Inhibition and recovery of tick functions in cattle repeatedly infested with *Boophilus microplus*. **J. Parasitol.**, 79(5): 710-715, 1993.
- BASTIANI, M.; HILLEBRAND, S.; HORN, F.; KIST, T. B.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 32(11): 1439-1446, 2002.

- BAUTISTA-GARFIAS, C. R.; MARTÍNEZ-CRUZ, M. A.; CÓRDOBA-ALVA, F. Lectin activity from the cattle tick (*Boophilus microplus*) saliva. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, 39(1-2): 83-89, 1997.
- BEHLING-KELLY, E. & CZUPRYNSKI, C. J. Endothelial cells as active participants in veterinary infections and inflammatory disorders. **Anim. Health Res. Rev.**, 8(1): 47-58, 2007.
- BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacol. Rev.**, 44(1): 1-80, 1992.
- BLAT, Y. & SEIFFERT, D. A renaissance for the contact system in blood coagulation? **Thromb. Haemost.**, 99(3): 457-460, 2008.
- BOWMAN, A. S.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. **Parasitol. Today**, 12(10): 388-396, 1996.
- BROSSARD, M. & WIKEL, S. K. Tick immunobiology. In: Bowman, A. S. & Nutall, P. A. **Ticks – Biology, Disease and control**. Cambridge University Press, New York, p. 186-204, 2008.
- CAMICAS, J. L.; HERVY J. P.; ADAM, F.; MOREL, P. C. **Les tique du monde**. Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, Paris, 1998.
- CESARMAN-MAUS, G. & HAJJAR, K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. **Br. J. Haematol.**, 129(3): 307-321, 2005.
- CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. **Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.**, 4(4): 375-396, 2004.
- CHAMPAGNE, D. E. & RIBEIRO, J. M. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 91(1): 13842, 1994.
- CHAMPAGNE, D. E. & VALENZUELA, J. G. Pharmacology of haematophagous arthropod saliva. In: Wikel, S. K. **The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships**. CAB International, Wallingford, p. 85–106, 1996.
- CIPRANDI, A.; DE OLIVEIRA, S. K.; MASUDA, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. **Exp. Parasitol.**, 114(1): 40-46, 2006.
- CRUZ, A. P.; SILVA, S. S.; MATTOS, R. T.; DA SILVA VAZ JR, I.; MASUDA, A.; FERREIRA, C. A. Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. **Vet. Parasitol.**, 158(1-2): 152-158, 2008.

- DÉRUAZ, M.; FRAUENSCHUH, A.; ALESSANDRI, A. L.; DIAS, J. M.; COELHO, F. M.; RUSSO, R. C.; FERREIRA, B. R.; GRAHAM, G. J.; SHAW, J. P.; WELLS, T. N.; TEIXEIRA, M. M.; POWER, C. A.; PROUDFOOT, A. E. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. **J. Exp. Med.**, 205(9):2019-2031, 2008.
- DICKINSON, R. G.; O'HAGAN, J. E.; SCHOTZ, M.; BINNINGTON, K. C.; HEGARTY, M. P. Prostaglandin in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, 54(5): 475-486, 1976.
- FERREIRA, C. A.; DA SILVA VAZ JR, I.; DA SILVA, S. S.; HAAG, K. L.; VALENZUELA, J. G.; MASUDA, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. **Exp. Parasitol.**, 101(1): 25-34, 2002.
- FRANCISCHETTI, I. M.; RIBEIRO, J. M.; CHAMPAGNE, D.; ANDERSEN, J. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **J. Biol. Chem.**, 275(17): 12639-12650, 2000.
- FRANCISCHETTI, I. M.; VALENZUELA, J.G.; ANDERSEN, J. F.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. 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. **Blood**, 99(10): 3602-3612, 2002.
- FRANCISCHETTI, I. M.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. 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*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 305(4): 869-875, 2003.
- FRANCISCHETTI, I. M.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. **Thromb. Haemost.**, 91(5): 886-898, 2004.
- FRANCISCHETTI, I. M.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thromb. Haemost.**, 94(1):167-74, 2005a.
- FRANCISCHETTI, I. M.; PHAM, V. M.; MANS, B. J.; ANDERSEN, J. F.; MATHER, T. N.; LANE, R. S.; RIBEIRO, J. M. The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 35(10): 1142-1161, 2005b.
- FRANCISCHETTI, I. M.; SEYDEL, K. B.; MONTEIRO, R. Q.; WHITTEN, R. O.; EREXSON, C. R.; NORONHA, A.L.; OSTERA, G. R.; KAMIZA, S. B.;



- MOLYNEUX, M. E.; WARD, J. M.; TAYLOR, T. E. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce tissue factor expression in endothelial cells and support the assembly of multimolecular coagulation complexes. **J. Thromb. Haemost.**, 5(1): 155-165, 2007.
- FRANCISCHETTI, I. M.; MANS, B. J.; MENG, Z.; GUDDERRA, N.; VEENSTRA, T. D.; PHAM, V. M.; RIBEIRO, J. M. An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 38(1): 1-21, 2008a.
- FRANCISCHETTI, I. M.; MENG, Z.; MANS, B. J.; GUDDERRA, N.; HALL, M.; VEENSTRA, T. D.; PHAM, V. M.; KOTSYFAKIS, M.; RIBEIRO, J. M. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. **J. Proteomics**, 71(5): 493-512, 2008b.
- FRANCISCHETTI, I. M.; SA-NUNES, A.; MANS, B. J.; SANTOS, I. M.; RIBEIRO, J. M. The role of saliva in tick feeding. **Front. Biosci.**, 14: 2051-2088, 2009.
- FURIE, B. & FURIE, B. C. Mechanisms of thrombus formation. **N. Engl. J. Med.**, 359(9): 938-949, 2008.
- GIBBONS, G. H. The vascular response to injury. In: Loscalzo, J., Schafer, A. I. **Thrombosis and hemorrhage**. Williams & Wilkins, Baltimore, p.307-320, 1998.
- GONZALES, J. C.; SILVA, N. R.; WAGNER, E. M. O ciclo parasitário de *Boophilus microplus* (Can. 1887) em bovinos estabulados. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, 2:25-34, 1974.
- GUIMARÃES, J.A. Conceitos atuais sobre a interação dos sistemas calicreína-cinina, coagulação, renina-angiotensina, complemento e fibrinólise. **Cien. Cult.**, 33: 1456-1459, 1981.
- GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. Editora Plêiade, São Paulo, 2001.
- HOFFMAN, M. & MONROE, D. M. A cell-based model of hemostasis. **Thromb. Haemost.**, 85(6): 958-965, 2001.
- HORN, S.C. & ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **Hora Vet.**, 23:12-32, 1985.
- HORN, F.; DOS SANTOS, P. C.; TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. **Arch. Biochem. Biophys.**, 384(1): 68-73, 2000.
- IBGE. **Produção pecuária municipal**. Volume 34. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 2006.

- INOKUMA, H.; KEMP, D. H.; WILLADSEN, P. Comparison of prostaglandin E2 (PGE2) in salivary gland of *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes holocyclus*, and quantification of PGE2 in saliva, hemolymph, ovary and gut of *B. microplus*. **J. Vet. Med. Sci.**, 56(6): 1217-1218, 1994.
- INOKUMA, H.; KERLIN, R. L.; KEMP, D. H.; WILLADSEN, P. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. **Vet. Parasitol.**, 47(1-2): 107-118, 1993.
- IWANAGA, S.; OKADA, M.; ISAWA, H.; MORITA, A.; YUDA, M.; CHINZEI, Y. Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Eur. J. Biochem.**, 270(9):1926-34, 2003.
- JENNY, N.S. & MANN, K.G., Coagulation cascade: an overview. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. **Thrombosis and hemorrhage**. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 3-27, 1998.
- JOHNSTON, T. H.; BANCROFT, M. J. A tick-resistant condition in cattle. **Proc. Royal Soc. Queensland**, 30: 219-317, 1918.
- KARCZEWSKI, J.; ENDRIS, R.; CONNOLLY, T. M. Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*. **J. Biol. Chem.**, 269(9):6702-6708, 1994.
- KELLER, P. M.; WAXMAN, L.; ARNOLD, B. A.; SCHULTZ, L. D.; CONDRA, C.; CONNOLLY, T. M. Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. **J. Biol. Chem.**, 268(8):5450-5456, 1993.
- KEMP, D. H. & BOURNE, A. *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle-tick larvae – studies *in vivo* and *in vitro*. **Parasitology**, 80: 487-496, 1980.
- KEMP, D. H.; HALES, J. R.; SCHLEGER, A. V.; FAWCETT, A. A. Comparison of cutaneous hyperemia in cattle elicited by larvae of *Boophilus microplus* and by prostaglandins and other mediators. **Experientia**, 39(7): 725-727, 1983.
- KERLIN, R. L. & HUGHES, S. Enzymes in saliva from four parasitic arthropods. **Med. Vet. Entomol.**, 6(2): 121-126. 1992.
- KLAFKE, G. M. Resistência de *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas. In: Pereira, M. C.; Labruna, M. B.; Szabó, M. J. P.; Klafke, G. M. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus – Biologia, controle e resistência**. MedVet Livros, São Paulo, p. 81-106, 2009.
- KOTSYFAKIS, M.; SÁ-NUNES, A.; FRANCISCHETTI, I. M.; MATHER, T. N.; ANDERSEN, J. F.; RIBEIRO, J. M. Antiinflammatory and immunosuppressive

- activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. **J. Biol. Chem.**, 281(36): 26298-26307, 2006.
- KROLL, M.H. & SULLIVAN, R. Mechanisms of platelet activation. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. **Thrombosis and hemorrhage**. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 261-291, 1998.
- LABRUNA, M. B. Combate contra o *R. (B.) microplus*. In: Pereira, M. C.; Labruna, M. B.; Szabó, M. J. P.; Klafke, G. M. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus – Biologia, controle e resistência**. MedVet Livros, São Paulo, p. 65-80, 2009.
- LABRUNA, M. B. & VERISSIMO, C. J. Notes on infestation by *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle, under rotational grazing and high stocking rate. **Arq. Inst. Biol.**, 68(2), 115–120, 2001.
- LABRUNA, M. B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A. J.; THOMPSON, C.; ESTRADA-PEÑA, A.; GUGLIELMONE, A. A.; JONGEJAN, F.; DE LA FUENTE, J. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evol. Biol.**, 9: 46, 2009.
- LAVOPIERRE, M. M. J. Feeding mechanisms of blood-sucking arthropods. **Nature**, 208: 302–303, 1964.
- LEEMON, D. M.; TURNER, L. B.; JONSSON, N. N. Pen studies on the control of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). **Vet. Parasitol.**, 156(3-4): 248-260, 2008.
- LERNER, E. A.; RIBEIRO, J. M.; NELSON, R. J.; LERNER, M. R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **J. Biol. Chem.**, 266(17): 11234-11236, 1991.
- LEWIS, G. P. Biochemical changes in local tissue injury. **Br. J. Dermatol.**, 85(5): 481-483, 1971.
- MacFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, 202: 498-499, 1964.
- MAKRIDES, S. C.; RYAN, U. S. Overview of the endothelium. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. **Thrombosis and hemorrhage**. Williams & Wilkins, Baltimore, p.295-306, 1998.
- MANN, K. G.; BUTENAS, S.; BRUMMEL, K. The dynamics of thrombin formation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 23(1): 17-25, 2003.
- MANS, B. J. & NEITZ, A. W. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 34(1): 1-17, 2004.

- MANS, B. J. & RIBEIRO, J. M. A novel clade of cysteinyl leukotriene scavengers in soft ticks. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 38(9): 862-870, 2008.
- MANS, B. J.; COETZEE, J.; LOUW, A. I.; GASPAR, A. R.; NEITZ, A. W. Disaggregation of aggregated platelets by apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Exp. Appl. Acarol.**, 24(4):271-82, 2000.
- MANS, B. J.; LOUW, A. I.; NEITZ, A. W. Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. **J. Biol. Chem.**, 277(24): 21371-21378, 2002.
- MANS, B. J.; LOUW, A. I.; NEITZ, A. W. The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, are part of the tick Lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses. **Mol. Biol. Evol.**, 20(7):1158-67, 2003.
- MANS, B. J.; RIBEIRO, J. M.; ANDERSEN, J. F. Structure, function, and evolution of biogenic amine-binding proteins in soft ticks. **J. Biol. Chem.**, 283(27): 18721-18733, 2008.
- MARKS, F. S.; RECK Jr., J.; ALMEIDA, L. L.; BERGER, M. O.; CORRÊA, A. M. R.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C.; CANAL, C. W. Porcine circovirus 2 (PCV2) induces a procoagulant state in naturally infected swine and in cultured endothelial cells. **Vet. Microbiol.**, *in press*, 2009.
- MARKWARDT, F. The development of hirudin as an antithrombotic drug. **Thromb. Res.**, 74(1): 1-23, 1994.
- MARTINS, J. R. Carrapato bovino: epidemiologia e controle. **Cad. Boas Prát. Prod.**, 115-136, 2004a.
- MARTINS, J. R. Tristeza parasitária bovina: aspectos epidemiológicos e estratégias de controle. **Cad. Boas Prát. Prod.**, 137-151, 2004b.
- MATSUOKA, T. & NARUMIYA, S. The roles of prostanoids in infection and sickness behaviors. **J. Infect. Chemother.**, 14(4): 270-278, 2008.
- MAXWELL, S. S.; STOKLASEK, T. A.; DASH, Y.; MACALUSO, K. R.; WIKEL, S. K. Tick modulation of the in-vitro expression of adhesion molecules by skin-derived endothelial cells. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 99(7):661-72, 2005.
- MERCHANT, S. R. & TABOADA, J. Dermatologic aspects of tick bites and tick-transmitted diseases. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, 21(1): 145-155, 1991.

- MINAMI, T.; SUGIYAMA, A.; WU, S. Q.; ABID, R.; KODAMA, T.; AIRD, W. C. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 24: 41-53, 2004.
- MONROE, D. M. & HOFFMAN, M. What does it take to make the perfect clot? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 26(1): 41-48, 2006.
- MOORE, C. G. Interdisciplinary research in the ecology of vector-borne diseases: opportunities and needs. **J. Vector Ecol.**, 33(2): 218-224, 2008.
- MOTOYASHIKI, T.; TU, A. T.; AZIMOV, D. A.; IBRAGIM, K. Isolation of anticoagulant from the venom of tick, *Boophilus calcaratus*, from Uzbekistan. **Thromb. Res.**, 110(4): 235-241, 2003.
- MURRELL, A. & BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Syst. Parasitol.**, 56:169–172, 2003.
- NAZARETH, R. A.; TOMAZ, L. S.; ORTIZ-COSTA, S.; ATELLA, G. C.; RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M.; MONTEIRO, R. Q. Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. **Thromb. Haemost.**, 96(1): 7-13, 2006.
- NIENABER, J.; GASPAR, A. R.; NEITZ, A. W. Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Exp. Parasitol.**, 93(2): 82-91, 1999.
- PEREIRA, M. C. Introdução ao *R. (B.) microplus*. In: Pereira, M. C.; Labruna, M. B.; Szabó, M. J. P.; Klafke, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – Biologia, controle e resistência**. MedVet Livros, São Paulo, p. 1-6, 2009a.
- PEREIRA, M. C. Taxonomia do subgênero *Boophilus* e suas espécies. In: Pereira, M. C.; Labruna, M. B.; Szabó, M. J. P.; Klafke, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – Biologia, controle e resistência**. MedVet Livros, São Paulo, p. 7-12, 2009b.
- PEREIRA, M. C. & LABRUNA, M. B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Pereira, M. C.; Labruna, M. B.; Szabó, M. J. P.; Klafke, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – Biologia, controle e resistência**. MedVet Livros, São Paulo, p. 15-56, 2009.
- PETERSEN, L. C.; BJØRN, S. E.; OLSEN, O. H.; NORDFANG, O.; NORRIS, F.; NORRIS, K. Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type-protease-inhibitor domains from tissue-factor-pathway inhibitor. **Eur. J. Biochem.**, 235(1-2): 310-316, 1996.
- PIPER, E. K.; JACKSON, L. A.; BAGNALL, N. H.; KONGSUWAN, K. K.; LEW, A. E.; JONSSON, N. N. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle

- infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 126(1-2): 110-119, 2008.
- PIPER, E. K.; JONSSON, N. N.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A. E.; MOOLHUIJZEN, P.; VANCE, M. E.; JACKSON, L. A. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Clin. Vaccine Immunol.**, 16(7): 1074-1086, 2009.
- PREVOT, P. P.; BESCHIN, A.; LINS, L.; BEAUFAYS, J.; GROSJEAN, A.; BRUYS, L.; ADAM, B.; BROSSARD, M.; BRASSEUR, R.; ZOUAOUI BOUDJELTIA, K.; VANHAMME, L.; GODFROID, E. Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. **FEBS J.**, 276(12): 3235-3246, 2009.
- RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, 32:463-78, 1987.
- RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents Dis.**, 4(3):143-52, 1995.
- RIBEIRO, J. M. & FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood-feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Ann. Rev. Entomol.**, 48: 73-88, 2003.
- RIBEIRO, J. M. & MATHER, T. N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. **Exp. Parasitol.**, 89(2): 213-21, 1998.
- RIBEIRO, J. M. & MODI, G. The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti, the main vector of human kala-azar. **J. Parasitol.**, 87(4): 915-917, 2001.
- RIBEIRO, J. M. & NUSSENZVEIG, R. H. The salivary catechol oxidase/peroxidase activities of the mosquito *Anopheles albimanus*. **J. Exp. Biol.**, 179: 273-287, 1993.
- RIBEIRO, J. M. & SPIELMAN, A. *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. **Exp. Parasitol.**, 62(2):292-297, 1986.
- RIBEIRO, J. M.; SARKIS, J. J.; ROSSIGNOL, P. A.; SPIELMAN, A. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Molec. Biol.**, 79(1): 81-86, 1984.
- RIBEIRO, J. M.; MAKOUL, G. T.; LEVINE, J.; ROBINSON, D. R.; SPIELMAN, A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **J. Exp. Med.**, 161(2):332-44, 1985.
- RIBEIRO, J. M.; MAKOUL, G. T.; ROBINSON, D. R. *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. **J. Parasitol.**, 74(6): 1068-1069, 1988.

- RIBEIRO, J. M.; MARINOTTI, O.; GONZALES, R. A salivary vasodilator in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **Br. J. Pharmacol.**, 101(4): 932-936, 1990.
- RIBEIRO, J. M.; ENDRIS, T. M.; ENDRIS, R. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. **Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.**, 100(1): 109-112, 1991.
- RIBEIRO, J. M.; ALARCON-CHAIDEZ, F.; FRANCISCHETTI, I. M.; MANS, B. J.; MATHER, T. N.; VALENZUELA, J. G.; WIKEL, S. K. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 36(2):111-129, 2006.
- RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks I: Tick anaemia. **Aus. J. Agric. Res.**, 8: 209-214, 1957.
- ROBERTS, J. A.; KERR, J. D. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. **J. Parasitol.**, 149: 485-489, 1976.
- RUGGERI, Z. M. & MENDOLICCHIO, G. L. Adhesion mechanisms in platelet function. **Circ. Res.**, 100(12): 1673-1685, 2007.
- SAMISH, M; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In: Bowman, A. S. & Nutall, P. A. **Ticks – Biology, Disease and control**. Cambridge University Press, New York, p. 447-469, 2008.
- SANGAMNATDEJ, S.; PAESEN, G. C.; SLOVAK, M.; NUTTALL, P. A. A high affinity serotonin and histamine-binding lipocalin from tick saliva. **Insect Mol. Biol.**, 11(1): 79-86, 2002.
- SANTI, L.; SILVA, W. O.; PINTO, A. F. M.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Differential immunoproteomics allows the identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related with *Rhipicephalus microplus* infection. **Res. Microbiol.**, in press, 2009.
- SANTOS, I. K.; VALENZUELA, J. G.; RIBEIRO, J. M.; DE CASTRO, M.; COSTA, J. N.; COSTA, A. M.; DA SILVA, E. R.; NETO, O. B.; ROCHA, C.; DAFFRE, S.; FERREIRA, B. R.; DA SILVA, J. S.; SZABÓ, M. P.; BECHARA, G. H. Gene discovery in *Boophilus microplus*, the cattle tick: the transcriptomes of ovaries, salivary glands, and hemocytes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1026: 242-246, 2004.
- SAVAGE, B.; CATTANEO, M.; RUGGERI, Z. M. Mechanisms of platelet aggregation. **Curr. Opin. Hematol.**, 8: 270-276, 2001.
- SILVA, P. H. & HASHIMOTO, Y. **Coagulação – visão laboratorial da hemostasia primária e secundária**. Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2006

- SILVA, W. O.; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. **Mycol. Res.**, *in press*, 2009.
- SIMMONDS, R. E. & LANE, D. A. Regulation of coagulation. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. **Thrombosis and hemorrhage**. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 45-76, 1998.
- SOMMER, C. Is serotonin hyperalgesic or analgesic? **Curr. Pain Headache Rep.**, 10(2):101-106, 2006.
- SONENSHINE, D. E. Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. In: Bowman, A. S. & Nutall, P. A. **Ticks – Biology, Disease and control**. Cambridge University Press, New York, p. 470-491, 2008.
- SZABÓ, M. P. J. Imunopatologia da resistência de bovinos ao carrapato *R. (B.) microplus*. In: Pereira, M. C.; Labruna, M. B.; Szabó, M. J. P.; Klafke, G. M. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus – Biologia, controle e resistência**. MedVet Livros, São Paulo, p. 107-126, 2009.
- TATCHELL, R. J. & BENNETT, G. F. *Boophilus microplus*: antihistaminic and tranquilizing drugs and cattle resistance. **Exp. Parasitol.**, 26: 396-377, 1969.
- TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. **J. Parasitol.**, 25: 57-81, 1939.
- TURNI, C.; LEE, R. P.; JACKSON, L. A. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. **Parasite Immunol.**, 24(7): 355-361, 2002.
- TURNI, C. ; LEE, R. P. ; JACKSON, L. A. A comparison of the immunosuppressive effects of salivary gland extracts from two laboratory strains of *Boophilus microplus*. **Int. J. Parasitol.**, 34(7): 833-838, 2004.
- TURNI, C.; LEE, R. P.; JACKSON, L. A. The effects of salivary gland extracts from *Boophilus microplus* ticks on mitogen-stimulated bovine lymphocytes. **Vet. Res. Commun.**, 31(5):545-552, 2007.
- VALENZUELA, J. G.; CHARLAB, R.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. **J. Biol. Chem.**, 275(25): 18717-18723, 2000.
- VAUGHAN, D. E. & DECLERCK, P. J. Fibrinolysis and its regulation. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. **Thrombosis and hemorrhage**. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 129-154, 1998.
- WANG, X.; COONS, L. B.; TAYLOR, D. B.; STEVENS, S. E. Jr.; GARTNER, T. K. Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet



- aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. **J. Biol. Chem.**, 271(30):17785-17790, 1996.
- WANG, X.; RIBEIRO, J. M.; BROCE, A. B.; WILKERSON, M. J.; KANOST, M. R. An insight into the transcriptome and proteome of the salivary gland of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 39(9): 607-614, 2009.
- WANG, M.; GUERRERO, F. D.; PERTEA, G.; NENE, V. M. Global comparative analysis of ESTs from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Genomics**, 8: 368, 2007.
- WIKEL, S. K. Histamine content of tick attachment sites and the effects of H1 and H2 histamine antagonists on the expression of resistance. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 76(2): 179-185, 1982.
- WIKEL, S. K. Immunology of the tick-host interface. In: Wikel, S. K. **The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships**. CAB International, Wallingford, p. 204-231, 1996a.
- WIKEL, S. K. Host immunity to ticks. **Ann. Rev. Entomol.**, 41: 1-22, 1996b.
- WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. In: Bowman, A. S. & Nutall, P. A. **Ticks – Biology, Disease and control**. Cambridge University Press, New York, p. 424-446, 2008.
- WILLADSEN, P. & MCKENNA, R. V. Vaccination with 'concealed' antigens: myth or reality? **Parasite Immunol.**, 13(6): 605-616, 1991.
- WILLADSEN, P. & RIDING, G. A. On the biological role of a proteolytic-enzyme inhibitor from the ectoparasitic tick *Boophilus microplus*. **Biochem. J.**, 189(2):295-303, 1980.
- ZHU, K.; BOWMAN, A. S.; BRIGHAM, D. L.; ESSENBERG, R. C.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). **Exp. Parasitol.**, 87(1):30-38, 1997.

## **ANEXOS**

## **CURRICULUM VITAE**

### **Versão resumida**

*Segundo recomendação do Programa Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) deve ser incluído, ao final da dissertação um currículo resumido do aluno.*

## **RECK Jr., J.**

### **1. DADOS PESSOAIS**

Nome: **José Reck Júnior**  
Local de nascimento: Rio Grande, RS, Brasil  
Data de nascimento: 22 de setembro de 1983

Endereço profissional: Laboratório de Bioquímica Farmacológica  
Centro de Biotecnologia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Av. Bento Gonçalves 9500 - Campus do Vale  
Setor IV - Prédio 43.431 - Lab. 214 / 217  
CEP 91501-970  
Bairro Agronomia - Porto Alegre - RS - Brasil

Telefone profissional: (55 51) 3308-6062 / 6082  
E-mail profissional: [jreck@cbiot.ufrgs.br](mailto:jreck@cbiot.ufrgs.br)

### **2. FORMAÇÃO:**

2002 – 2007: Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV/RS): 10591  
*Monografia:* Papel do sistema caliceínas-cininas no envenenamento por animais peçonhentos.  
*Trabalho de conclusão:* Caracterização bioquímica e farmacológica dos efeitos da bradicinina (BK) no leito vascular hepático na hipertensão em modelos animais  
*Orientação:* Carlos Termignoni & Jorge Almeida Guimarães.  
*Bolsista:* Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

- 2008 – 2009: Mestrado em Biologia Celular e Molecular  
Centro de Biotecnologia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
*Dissertação:* Farmacologia da saliva do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: papel da modulação da hemostasia na relação parasita-hospedeiro  
*Orientação:* Carlos Termignoni & Jorge Almeida Guimarães.  
*Bolsista:* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- 2009 - : Doutorado *em andamento* em Biologia Celular e Molecular  
Centro de Biotecnologia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
*Orientação:* Carlos Termignoni & Jorge Almeida Guimarães.  
*Bolsista:* Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

### 3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS:

- 2002 – 2007: Iniciação científica no Centro de Biotecnologia  
Atuando como membro dos grupos de Bioquímica Farmacológica e de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas do Centro de Biotecnologia - UFRGS.  
Execução de projetos de pesquisa envolvendo bioquímica e fisiopatologia da hemostasia e do sistema calicreínas-cininas; toxinas animais; bioquímica de parasitos hematófagos e modelos animais.
- 2004 – 2006: Treinamento como plantonista no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da UFRGS  
Atuando no atendimento clínico e cirúrgico do serviço de emergência do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS (1500 horas).
- 2005: Atividade de extensão - projeto de controle reprodutivo de animais  
Atuando na execução de procedimentos cirúrgicos de controle reprodutivo de cães e gatos da comunidade em ação promovida pelo Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS (12 meses).
- 2007: Estágio curricular na Escola Paulista de Medicina (EPM), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)  
Atuando como membro do departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina (EPM), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).  
Execução de projetos de pesquisa envolvendo a relação dos sistemas calicreínas-cininas e renina-angiotensina com a hipertensão, e modelos animais.

#### 4. DISTINÇÕES

- 2002: 1º lugar no concurso vestibular no curso de Medicina Veterinária (UFRGS)  
2004: Destaque iniciação científica UFRGS – Área de Medicina Veterinária  
2005: Destaque iniciação científica UFRGS – Área de Patologia  
2006: Destaque iniciação científica UFRGS – Área de Farmacologia  
2008: 1º lugar na seleção para mestrado – Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM, UFRGS)  
2009: 1º lugar na seleção para doutorado – Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM, UFRGS)

#### 5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

RECK Jr., J.; BERGER, M. O.; TERRA, R. M. S.; MARKS, F. S.; da SILVA VAZ JÚNIOR, I.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 56-62, 2009.

RECK Jr., J.; BERGER, M. O.; MARKS, F. S.; ZINGALI, R.; CANAL, C. W.; FERREIRA, C. A. S.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Pharmacological action of tick saliva upon hemostasis and the neutralization ability of sera from repeated infested hosts. **Parasitology** (London), *in press*, 2009.

BERGER, M. O.; RECK Jr., J.; TERRA, R. M. S.; PINTO, A. F. M.; TERMIGNONI, C.; GUIMARÃES, J. A. The *Lonomia obliqua* caterpillar envenomation causes platelet hypoaggregation and blood incoagulability in rats. **Toxicon**, *in press*, 2009.

MARKS, F. S.; RECK Jr., J.; ALMEIDA, L. L.; BERGER, M. O.; CORRÊA, A. M. R.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C.; CANAL, C. W. Porcine circovirus 2 (PCV2) induces a procoagulant state in naturally infected swine and in cultured endothelial cells. **Veterinary Microbiology** (Amsterdam), *in press*, 2009.

BOHRER, C. B.; RECK Jr., J.; FERNANDES, D.; de SORDI, R.; ASSREUY, J.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Kallikrein kinin system activation by *Lonomia obliqua* caterpillar bristles: Involvement in edema and hypotension responses to envenomation. **Toxicon**, v. 49, p. 663-669, 2007.

#### 6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

RECK Jr., J.; BERGER, M. O.; BANDARRA, P. M.; DRIEMEIER, D.; TERMIGNONI, C.; GUIMARÃES, J. A. Systemic pathological alterations caused by *Lonomia obliqua* caterpillar envenomation in rabbits. In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology, 2009, Recife - PE - Brasil. Anais, 2009.

BERGER, M. O.; RECK Jr., J.; TERRA, R. M. S.; PINTO, A. F. M.; TERMIGNONI, C.; GUIMARÃES, J. A. In vitro activity of *Lonomia obliqua* caterpillar venom on human platelets. In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology, 2009, Recife - PE - Brasil. Anais, 2009.

BERGER, M. O.; RECK Jr., J.; TERRA, R. M. S.; PINTO, A. F. M.; TERMIGNONI, C.; GUIMARÃES, J. A. *Lonomia obliqua* caterpillar envenomation causes platelet hypoaggregation and blood incoagulability in rats. In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology, 2009, Recife - PE - Brasil. Anais, 2009.

RECK Jr., J.; BERGER, M. O.; MARKS, F. S.; CANAL, C. W.; ZINGALI, R.; FERREIRA, C. A. S.; TERMIGNONI, C.; GUIMARÃES, J. A. Pharmacological activities of tick saliva upon hemostasis and the neutralization ability of cattle hyperimmune serum. In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology, 2009, Recife - PE - Brasil. Anais, 2009.

RECK Jr., J.; BERGER, M. O.; TERRA, R. M. S.; MARKS, F. S.; da SILVA VAZ JÚNIOR, I.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Hemostatic disorders associated with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. In: VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens (TTP-6), 2008, Buenos Aires - Argentina. Anais, 2008.

LORENZINI, D. M.; RECK Jr., J.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Proteomic preliminar analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva. In: VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens (TTP-6), 2008, Buenos Aires - Argentina. Anais, 2008.

MARKS, F. S.; RECK Jr., J.; ALMEIDA, L. L.; BARCELLOS, D. E. S.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C.; CANAL, C. W. Porcine circovirus 2 (PCV 2) induces a procoagulant state in naturally infected swines and in cultured endothelial cells. In: XIX Encontro Nacional de Virologia, 2008, Caxambu - MG - Brasil. Anais, 2008.

RECK Jr., J.; MARKS, F. S.; CORRÊA, A. M. R.; MACAGNAN, M.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S.; CANAL, C. W.; TERMIGNONI, C. Coagulopathy and viral vasculitis induced by Porcine Circovirus Type 2 (PCV 2) infection in swines. In: 10th The International Union of Biochemistry and Molecular Biology Conference, 2007, Salvador - BA - Brasil. Anais, 2007.

BERGER, M. O.; RECK Jr., J.; TERRA, R. M. S.; PINTO, A. F. M.; TERMIGNONI, C.; GUIMARÃES, J. A. Effects of *Lonomia obliqua* caterpillar venom on blood platelets. In: 10th The International Union of Biochemistry and Molecular Biology Conference, 2007, Salvador - BA - Brasil. Anais, 2007.

RECK Jr., J.; BERGER, M. O.; TERRA, R. M. S.; MARKS, F. S.; da SILVA VAZ JÚNIOR, I.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Effects of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation on the host hemostatic system. In:

10th The International Union of Biochemistry and Molecular Biology Conference, 2007, Salvador- BA - Brasil. Anais, 2007.

BERASAIN, P.; BOHRER, C. B.; MANDADJI, M.; RECK Jr., J.; CARMONA, C.; GONI, F.; KIRST, T. B. L.; TERMIGNONI, C. A novel kininase is present in *Fasciola hepatica* excretion/secretion products. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2006, Águas de Lindóia. Anais, 2006.

TERMIGNONI, C.; RECK Jr., J.. Interação parasita-hospedeiro: o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e a modulação da ação de mediadores pró-inflamatórios. In: 14 Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & 2 Simpósio Latino-americano de Rickettsioses, 2006, Ribeirão Preto-SP. Anais, 2006. v. Único. p. 233-233.

RECK Jr., J.; BERGER, M. O.; TERRA, R. M. S.; MARKS, F. S.; da SILVA VAZ JÚNIOR, I.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Avaliação dos parâmetros hemostáticos de bovinos infestados pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: 14 Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & 2 Simpósio Latino-americano de Rickettsioses, 2006, Ribeirão Preto. Anais, 2006. v. Único. p. 232-232.

MARKS, F. S.; RECK Jr., J.; CORRÊA, A. M. R.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C.; CANAL, C. W. Hemostatic disorders associated to Porcine Circovirus 2 (PCV 2) infection in swines. In: XVII Encontro Nacional de Virologia, 2006, Campos do Jordão - SP. Virus - Reviews & Research. Rio de Janeiro, 2006. v. 11. p. 97-97.

RECK Jr., J.; BOHRER, C. B.; TERMIGNONI, C. Cattle tick *Boophilus microplus* inhibits histamine, bradykinin and contact system activities. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2005, Águas de Lindóia. Anais, 2005.

RECK Jr., J.; BOHRER, C. B.; TERMIGNONI, C. Caracterização farmacológica de moléculas do carrapato bovino com ação supressora sobre a resposta inflamatória do hospedeiro para possível utilização como alvos de controle imunológico. In: Jornada Nacional de Iniciação Científica - Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - SBPC, 2005, Fortaleza, 2005.

RECK Jr., J.; BOHRER, C. B.; TERMIGNONI, C. Modulação da resposta inflamatória no parasitismo do carrapato bovino *Boophilus microplus*. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Porto Alegre - RS. Revista de Patologia Tropical. Goiânia - GO - Brasil, 2005. v. 34.

## **7. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR (cursos de curta duração)**

- 2008: Citometria de fluxo  
Fundação Universitária de Cardiologia (IC-FUC)
- 2007: Medicina de animais selvagens  
Universidade de São Paulo (USP)
- 2006: Dermatologia em cães e gatos  
Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (ANCLIVEPA – RS)
- 2005: Manipulação Genética  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA- UFRGS)
- 2005: Experimentação Animal  
UFRGS
- 2005: Biologia Molecular aplicada à Clonagem Gênica  
UFRGS
- 2005: Curso Teórico-prático de Ortopedia e Traumatologia Veterinária  
Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da UFRGS
- 2004: Inseminação Artificial em Bovinos  
Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio Grande do Sul (EMATER-RS).
- 2004: Fundamentos e Aplicações da Eletroforese Capilar  
Is Biotech Co.

## **8. ATIVIDADES DE ENSINO**

- 2008-2009: Atividade didática durante o curso de mestrado como docente colaborador da disciplina de *Biofísica Médica* (BIO10019) do curso de graduação em *Medicina*, ministrando aulas teóricas (30 horas).
- 2008: Atividade de didática no curso de férias sobre o método científico para alunos e professores do ensino médio (aulas teóricas e práticas), promovido pelo Centro de Biotecnologia, UFRGS (80 horas).



## **9. ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS**

2008: Curso de férias - O método científico para alunos e professores do ensino médio. Centro de Biotecnologia, UFRGS. Porto Alegre, RS.

2006: Curso teórico-prático de atendimento de emergência em animais. Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), UFRGS.

2006: Curso teórico-prático de atualização em dermatologia animal. Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), UFRGS.

2006: VII Congresso Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC.

