

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MICROFILINA, O
SEGUNDO INIBIDOR DE TROMBINA DA SALIVA DO
CARRAPATO *Boophilus microplus***

Alessandra Ciprandi

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica
como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Aoi Masuda

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Termignoni

Porto Alegre, junho de 2005

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Carlos Termignoni pelas oportunidades que me ofereceu, pela orientação, exemplo, amizade e paciência em tantos anos de convivência;

À profa. Aoi Masuda pela orientação e pelos ensinamentos;

À profa. Fabiana Horn pela amizade e pelas sugestões;

Ao prof. Jorge Guimarães e o pessoal de seu laboratório pelos ensinamentos e sugestões, incentivo e amizade;

Aos profs. Maria Aparecida Juliano e Luiz Juliano, da Universidade Federal de São Paulo, e ao Dr. Lewis Greene, da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto, pela colaboração no trabalho;

À profa. Russolina Zingali e sua equipe pela atenção e dedicação com que me receberam no laboratório na Universidade Federal do Rio de Janeiro;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Peptidases (Matias, Liliana, Bruna, Adriana, Andréia, Juliana, José e Cláudio) e do Grupo Carrapato (aos profs. Itabajara e Carlos Alexandre e em especial à Daniela) do Centro de Biotecnologia da UFRGS que sempre me ajudaram e incentivaram;

Ao Centro de Biotecnologia pela infra-estrutura necessária para a conclusão deste trabalho;

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, aos professores desse programa e aos seus funcionários, em especial à Cléia;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Aos meus amigos, aqueles que se alegraram com meus sucessos e me incentivaram nas dificuldades;

À minha amiga Nádia, pela amizade, hospedagem e palavras de coragem que sempre me ofereceu;

À minha família pelo amor e pelo apoio incondicional;

À Deus, pela belíssima criação.

“Faço votos para que aprendas
a amar as tempestades em vez de fugir delas.”

Gibran Khalil Gibran

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
LISTA DE ABREVIATURAS.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Hemostasia.....	14
1.1.1 Agregação plaquetária.....	14
1.1.2 Coagulação sanguínea.....	17
1.1.3 Regulação da coagulação sanguínea.....	21
1.1.4 Sistema fibrinolítico.....	23
1.2 Trombina.....	24
1.3 Animais Hematófagos.....	29
1.3.1 Importância da saliva na hematofagia.....	29
1.3.2 Anticoagulantes e antiplaquetários salivares.....	33
1.4 Carrapato bovino.....	36
1.4.1 Ciclo de vida.....	37
1.4.2 Controle do parasita.....	40
2 OBJETIVOS.....	43
3 METODOLOGIA.....	44
3.1 Reagentes.....	44
3.2 Métodos.....	45
3.2.1 Obtenção de carrapatos.....	45
3.2.2 Obtenção de saliva.....	45
3.2.3 Purificação da microfilina.....	47

3.2.3.1 Cromatografia de gel filtração.....	47
3.2.3.2 Ultrafiltração em membrana de exclusão de 3 kDa.....	47
3.2.3.3 Cromatografia de afinidade trombina-Sepharose.....	48
3.2.3.4 Medida de proteína.....	49
3.2.4 Espectrometria de massas.....	49
3.2.5 Análise de aminoácidos.....	49
3.2.6 Caracterização da atividade da microfilina.....	50
3.2.6.1 Ensaio de tempo de recalcificação.....	51
3.2.6.2 Ensaio de coagulação do fibrinogênio.....	51
3.2.6.3 Ensaio com substrato cromogênico.....	52
3.2.6.4 Ensaio com substrato fluorogênico.....	52
3.2.6.5 Ensaio de agregação plaquetária.....	53
3.2.6.6 Teste de estabilidade térmica.....	53
3.2.6.7 Ação sobre outras enzimas.....	54
4 RESULTADOS.....	55
4.1 Purificação da microfilina.....	55
4.2 Determinação da massa molecular.....	58
4.3 Análise de aminoácidos.....	58
4.4 Caracterização da atividade da microfilina.....	61
4.4.1 Inibição da atividade da trombina sobre fibrinogênio.....	61
4.4.2 Efeito da microfilina na atividade da trombina sobre substratos sintéticos.....	61
4.4.3 Inibição da agregação plaquetária induzida por trombina.	64
4.5 Estabilidade térmica do peptídeo.....	64
4.6 Ação sobre outras enzimas.....	68
5 DISCUSSÃO.....	75
6 CONCLUSÕES.....	83
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXO.....	96

RESUMO

A saliva do carrapato bovino *Boophilus microplus* contém dois inibidores de trombina: o BmAP e a microfilina. Este trabalho apresenta a purificação e a caracterização deste último anticoagulante. A microfilina foi purificada da saliva por cromatografia de gel filtração, ultrafiltração em membrana de exclusão de 3 kDa e cromatografia de afinidade em trombina-Sepharose. A análise por espectrometria de massas mostrou uma massa molecular de 1770 Da. Com uma composição de 16 aminoácidos, a microfilina é o segundo menor inibidor peptídico de trombina já descrito. A microfilina inibe a fibrinocoagulação e a agregação plaquetária induzida por trombina com IC₅₀ de 5 µM. Como ela não inibe a atividade amidolítica da enzima sobre S2238, mas inibe a hidrólise de um substrato sintético longo que interage com o exosítio I da trombina, o mecanismo de ação proposto para a microfilina é o bloqueio do exosítio I da enzima. A microfilina é resistente à temperatura e não inibe a atividade amidolítica de fXa, plasmina, proteína C ativada, uroquinase, quimiotripsina e tripsina. O estudo mais detalhado da microfilina permitirá sua avaliação como antígeno contra o carrapato e/ou como droga antitrombótica.

ABSTRACT

Saliva of the cattle tick *Boophilus microplus* contains two thrombin inhibitors: BmAP and microphilin. This work presents the purification and characterization of the latter anticoagulant. The microphilin was purified from the saliva by gel filtration, ultrafiltration through a 3 kDa cut-off membrane and affinity chromatography in a thrombin-Sepharose resin. Analysis by mass spectrometry showed a molecular mass of 1770 Da. Due to its 16 amino acid composition microphilin is the second smallest thrombin inhibitor peptide known until now. Microphilin inhibits fibrinocoagulation and thrombin induced platelet aggregation with IC_{50} of 5 μ M. As it does not inhibit the amidolytic activity of the enzyme upon S2238 but inhibits the hydrolysis of a substrate that blocks both catalytic site and anion exosite I, we propose a mechanism based on the blockade of thrombin exosite I. Microphilin is temperature resistant and does not inhibit the amidolytic activity of fXa, plasmin, activated protein C, urokinase, chymotrypsin and trypsin. Further studies will contribute to evaluate the microphilin use as an antigen against tick and/or as antithrombotic drug.

LISTA DE ABREVIATURAS

- A₄₀₅: absorvância no comprimento de onda 405 nm
A₆₅₀: absorvância no comprimento de onda 650 nm
ADP: adenosina difosfato
cAMP: AMP (adenosina monofosfato) cíclico
APC: proteína C ativada
ATP: adenosina trifosfato
BAPNA: benzoil-arginil-*p*-nitroanilida
BmAP: *Boophilus microplus Anticoagulant Protein*
BmTIs: *Boophilus microplus Trypsin Inhibitors*
BSA: albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)
BYC: *Boophilus microplus Yolk pro-Cathepsin D*
Bz: benzoil
cDNA: DNA (ácido desoxirribonucléico) complementar
CNBr: brometo de cianogênio
C-terminal: carbóxi-terminal
DAG: diacilglicerol
EGF: fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)
FT: fator tecidual
Gla: γ -carboxiglutamato
cGMP: GMP (guanosina monofosfato) cíclico
GP: glicoproteína
HEPES: ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)etanosulfônico
IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato
KDa: kilodáton

K_i: Constante de Inibição

K_m: constante de Michaelis

LAPP: *Leech Antiplaquet Protein*

MALDI-TOF: ionização por dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*)

N-terminal: amino-terminal

PAF: fator de agregação plaquetária (*Platelet Activating Factor*)

PAI: inibidor do ativador de plasminogênio (*Plasminogen Activator Inhibitor*)

PAR: receptores ativados por protease (*Protease-Activated Receptor*)

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet-derived Growth Factor*)

PGI₂: prostaciclina

PM: peso molecular

pNA: *p*-nitroanilina

PPACK: H-D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona

PTC: feniltiocarbamil

RFU: unidade relativa de fluorescência

RGD: Arg-Gly-Asp

RNAi: RNA (ácido ribonucléico) de interferência

mRNA: RNA (ácido ribonucléico) mensageiro

RPAI: *Rhodnius prolixus Aggregation Inhibitor*

TAFI: inibidor de fibrinólise ativado por trombina (*Thrombin-activatable Fibrinolysis Inhibitor*)

TAP: *Tick Anticoagulant Peptide*

TFPI: inibidor da via extrínseca (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*)

TM: trombomodulina

t-PA: ativador de plasminogênio tipo tecidual

TTI: *Tsetse Thrombin Inhibitor*

TXA₂: tromboxano A₂

V_{max}: velocidade máxima

Os zimogênios dos fatores da coagulação são abreviados como "f" seguido do número (ex.: fX) e os fatores ativados aparecem seguidos de "a" (ex.: fXa).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da cascata da coagulação.

Figura 2: Representação em fita da estrutura tridimensional da trombina.

Figura 3: Esquema do ciclo de vida do *B. microplus*.

Figura 4: Coleta de saliva de *B. microplus*.

Figura 5: Cromatografia de gel filtração de saliva bruta.

Figura 6: Cromatografia de afinidade trombina-Sepharose.

Figura 7: Espectrometria de massas da microfilina em MALDI-TOF.

Figura 8: Inibição da coagulação do fibrinogênio pela microfilina.

Figura 9: Efeito da microfilina sobre a hidrólise de substrato sintético curto pela trombina.

Figura 10: Efeito da microfilina sobre a hidrólise de substrato sintético longo pela trombina.

Figura 11: Inibição da agregação plaquetária induzida por trombina pela microfilina.

Figura 12: Teste de estabilidade térmica da microfilina.

Figura 13: Efeito da microfilina sobre a atividade amidolítica do fator Xa.

Figura 14: Efeito da microfilina sobre a atividade amidolítica da plasmina.

Figura 15: Efeito da microfilina sobre a atividade amidolítica da proteína C ativada.

Figura 16: Efeito da microfilina sobre a atividade amidolítica da uroquinase.

Figura 17: Efeito da microfilina sobre a atividade amidolítica da tripsina.

Figura 18: Efeito da microfilina sobre a atividade amidolítica da quimiotripsina.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Substâncias anticoagulantes de animais hematófagos.

Tabela 2: Composição mínima de aminoácidos da microfílina.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemostasia

A hemostasia é um processo importante para a sobrevivência de animais superiores. Em mamíferos, a contração vascular, a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea são os principais processos responsáveis por evitar a perda excessiva de sangue após uma lesão vascular e sinalizar para a reconstrução do tecido lesado.

1.1.1 Agregação plaquetária

As plaquetas têm um papel importante na hemostasia. Após uma lesão vascular, alteração no fluxo sanguíneo ou estímulo químico, elas reconhecem estruturas subendoteliais, aderem ao local lesado, são ativadas e secretam substâncias que recrutam mais plaquetas para formar um tampão plaquetário. Elas são também essenciais na formação do coágulo de fibrina por fornecer a superfície que acelera as reações enzimáticas envolvidas nesse processo.

As respostas das plaquetas resultam de eventos intracelulares desencadeados pela interação de agonistas com receptores específicos em sua superfície. Existe uma grande diversidade desses sinalizadores: a trombina formada na cascata da coagulação, produtos de secreção de plaquetas e de outras células como ADP, serotonina, PAF (fator de agregação plaquetária), tromboxano A₂ (TXA₂), fator de von Willebrand e componentes da matriz extracelular como o colágeno.

A rapidez da resposta das plaquetas é essencial para a função hemostática e está relacionada com a disponibilidade de um conjunto de receptores para os diferentes agonistas, uma vez que as plaquetas são anucleadas e não sintetizam essas moléculas (ANDREWS *et al.* 1997). Entre estes receptores estão PAR-1 e PAR-4 (receptores ativados por protease) e GPIb para trombina (OFOSU, 2003), as integrinas GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$) e GPIb-V-IX e GPVI para colágeno (CLEMETSON e CLEMETSON, 2001) e P2Y₁, P2Y₁₂ e P2X₁ para ADP (GACHET, 2001).

Os receptores plaquetários são do tipo acoplado a proteína G. A ligação com o agonista promove a ativação da fosfolipase C, responsável pela produção dos segundos mensageiros inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e 1,2-diacilglicerol (DAG). Estes, por sua vez, provocam um aumento de cálcio citoplasmático, que está envolvido em eventos que levam à ativação das plaquetas, alteração da forma e secreção de grânulos (KROLL e SULLIVAN, 1998).

A secreção de grânulos é um evento importante que contribui para manter e aumentar a agregação plaquetária e propagar a resposta hemostática. Entre

as substâncias liberadas estão fibrinogênio, fibronectina e outras proteínas de adesão, fator de von Willebrand, plasminogênio, fator V, PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e outros fatores de crescimento, ADP, ATP, serotonina e íons cálcio.

Os receptores de superfície são importantes também na adesão e agregação plaquetárias. Os principais receptores envolvidos nesses processos são as integrinas glicoproteína Ia/IIa ($\alpha_2\beta_1$) e glicoproteína IIb/IIIa ($\alpha_{2b}\beta_3$). A GP Ia/IIa liga-se ao fator de von Willebrand acumulado na matriz extracelular, iniciando assim a adesão plaquetária ao local da lesão tecidual. A GP IIb/IIIa apresenta-se numa forma inativa na membrana da plaqueta e é o receptor mais abundante na superfície. A ativação plaquetária por outros agonistas leva a alterações conformacionais nesse receptor que passa a reconhecer e ligar proteínas contendo a seqüência de aminoácidos Arg-Gli-Asp (RGD), principalmente fibrinogênio e fator de von Willebrand (PEERSCHKE e LÓPEZ, 1998). O fibrinogênio tem estrutura simétrica e é capaz de ligar-se a duas GP IIb/IIIa, formando uma ponte entre as plaquetas que é a base do agregado plaquetário.

A agregação plaquetária é modulada negativamente pelos níveis de cAMP e cGMP nas plaquetas e pela prostaciclina (PGI_2), produzida pela parede vascular (BATLOUNI, 1993).

1.1.2 Coagulação sanguínea

A formação do coágulo de fibrina é resultado de uma série de reações enzimáticas em cascata finamente controladas. Três tipos de proteínas participam dessas reações: os zimogênios (precursores ou formas inativas) que são ativados por proteólise limitada e convertidos em serino-proteases ativas; os co-fatores não-enzimáticos e as proteínas integrais de membrana. Os zimogênios que participam dessas reações têm sua estrutura dividida em três domínios: uma extremidade N-terminal com 9 a 12 resíduos de γ -carboxiglutamato (Gla) cuja carboxilação é dependente de vitamina K, um domínio intermediário composto por domínios do fator de crescimento epidérmico (EGF, ou por domínios *kringle* na protrombina) e um domínio de serino-protease tipo tripsina na extremidade C-terminal, onde ocorre a ativação por proteólise limitada (ZWAAL *et al.*, 1998).

A maioria das reações da cascata da coagulação são dependentes de Ca^{2+} e ocorrem em complexos ancorados na superfície de membranas celulares. Quando ativadas, células sanguíneas e plaquetas expõem na face externa da membrana os lipídios fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, normalmente localizados predominantemente na face citoplasmática. A associação das proteínas com esses lipídios ocorre via ligação do domínio Gla da proteína com Ca^{2+} e grupos fosfato, amino e carbóxi do lipídio de membrana e é ajudada pela interação de resíduos hidrofóbicos expostos após a ligação do complexo Gla- Ca^{2+} com a camada bilipídica (ZWAAL *et al.*, 1998).

A formação desses complexos com membranas aumenta a velocidade da reação e reduz o K_m para os substratos. Isso ocorre provavelmente por concentração dos substratos no local da reação e por mudanças de conformação durante a formação do complexo com a membrana que favorecem a cinética da formação do complexo enzima-substrato. Além disso, esses complexos com membranas de células ativadas limitam a coagulação ao local da lesão vascular.

A cascata da coagulação é didaticamente dividida em via intrínseca e via extrínseca, que convergem para uma via “comum” com a formação do fator Xa. Essas vias não ocorrem independentemente, mas aceita-se que a via extrínseca tem o papel de iniciar a formação de fibrina enquanto a via intrínseca é importante no crescimento e manutenção da coagulação (DAVIE *et al.*, 1991). Um esquema das reações em cascata da coagulação sanguínea está mostrado na figura 1.

A via extrínseca requer um fator externo ao ambiente intravascular chamado fator tecidual (FT). Trata-se de uma glicoproteína integral de membrana de células que não estão normalmente em contato com o sangue circulante, como fibroblastos, queratinócitos e células epiteliais. Quando ocorre uma lesão vascular, o fator tecidual é exposto e combina-se com o fVIIa plasmático, na presença de íons cálcio. O fVIIa é ativado supostamente por traços de fXa circulante, mas permanece numa forma “incompetente” até ligar-se com o FT, que induz mudanças conformacionais na proteína e torna-a uma serino-protease ativa (EIGENBROT e KIRCHHOFER, 2002).

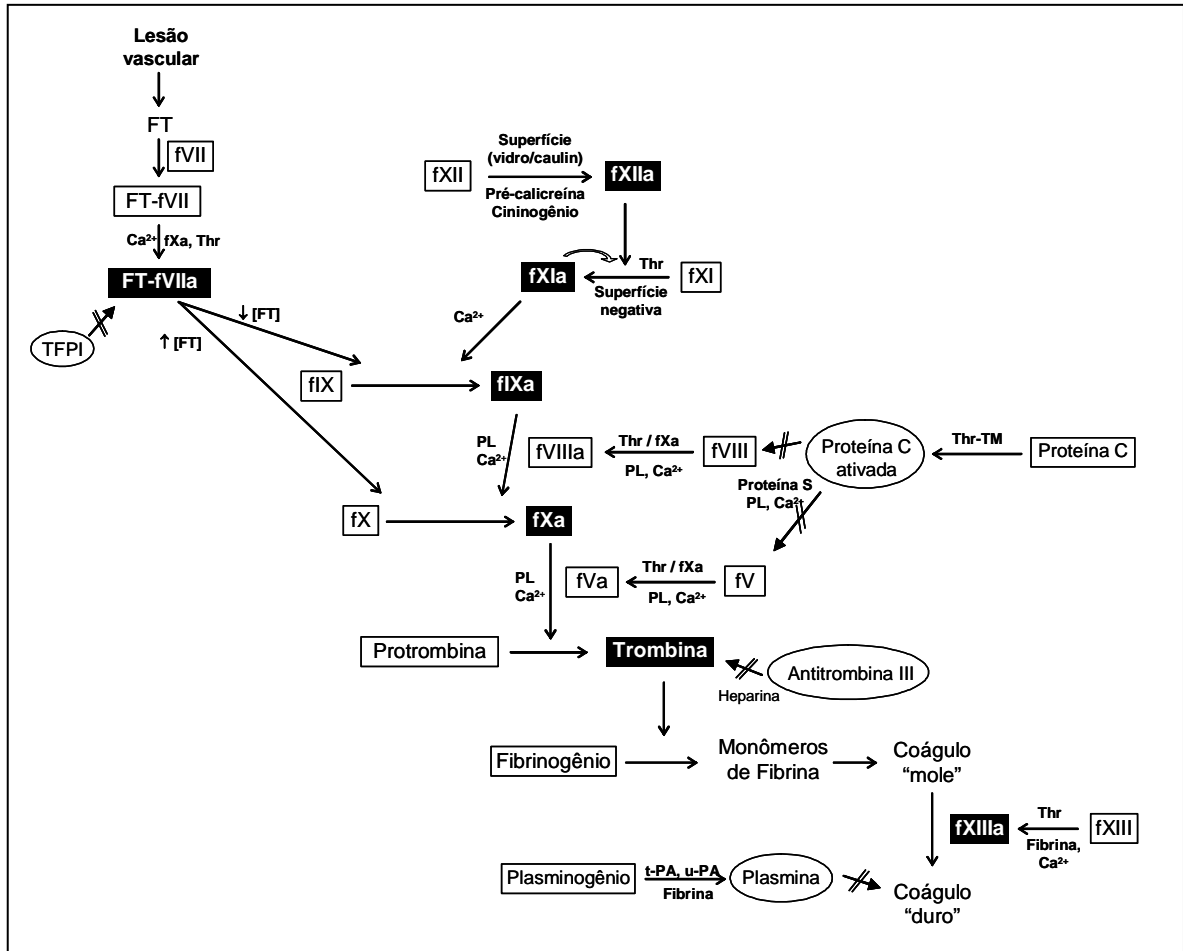


Figura 1: Esquema da cascata da coagulação. Os retângulos escuros mostram os fatores ativados e os claros os fatores inativos e os que não são enzimas. Os componentes circulares fazem parte do sistema de regulação da cascata. A inativação é representada com uma seta cortada. FT: fator tecidual; Thr: trombina; TFPI: inibidor da via extrínseca; PL: fosfolípido, t-PA: ativador de plasminogênio tipo tecidual; u-PA: uroquinase; TM: trombosmodulina

O complexo fVIIa-FT converte o fator X na serino-protease fXa pela clivagem da ligação peptídica Arg₅₂-Ile. O fXa forma com o fVa (ativado por fXa ou trombina) o complexo protrombinase, ligado à membrana por Ca²⁺ e fosfolipídios. A protrombinase converte protrombina em trombina pela hidrólise das ligações peptídicas Arg₂₇₁-Thr e Arg₃₂₀-Ile (DAVIE *et al.*, 1991).

A trombina é a enzima responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina. A clivagem de uma ligação peptídica em cada uma das cadeias α (ligação Arg₁₈-Gly) e β (ligação Arg₁₆-Gly) do fibrinogênio pela trombina resulta na liberação de quatro fibrinopeptídeos e dá origem a monômeros de fibrina com novas seqüências N-terminais (DAVIE *et al.*, 1991). As novas extremidades de cada monômero ligam-se ao monômero adjacente, levando à polimerização linear da fibrina em um coágulo insolúvel.

A estabilização do coágulo é feita pelo fXIIIa, uma cisteíno-transglutaminase que faz ligações cruzadas entre monômeros de fibrina, pela formação de ligações ϵ -(γ -glutamil)-lisina entre duas moléculas adjacentes. A ativação do fator XIII a fXIIIa dá-se por ação da trombina, em reação acelerada pela fibrina já formada (JENNY e MANN, 1998).

O complexo fVIIa-FT pode também ativar o fIX por hidrólise de duas ligações peptídicas, Arg₁₄₅-Ala e Arg₁₈₀-Val. A ativação do fIX é favorecida quando a quantidade de FT torna-se limitada pelo tamanho da lesão vascular. A ativação do fIX e do fX depende da concentração de FT, já que o K_m e o V_{max} variam com a concentração desse último (DAVIE *et al.*, 1991). O fIXa forma um complexo com o fator VIIIa (ativado pela trombina), Ca²⁺ e

fosfolipídios. Este complexo (complexo “tenase”) ativa o fX por proteólise limitada do mesmo modo que a ativação pelo complexo fVIIa-FT.

A via intrínseca da cascata da coagulação é assim denominada porque requer apenas fatores presentes no plasma. Esta via é iniciada pela ativação da glicoproteína plasmática fXI pela trombina na presença de superfície carregada negativamente, como sulfato, heparina ou dextran sulfato, por clivagem de uma ligação Arg₃₆₉-Ile em cada uma das duas subunidades. O fator XI ativado contém dois sítios catalíticos, capazes de ativar fXI em fXIa de forma autocatalítica e fIX em fIXa. O fator XIIa, pré-caliceína plasmática e cininogênio de alto peso molecular também podem ativar o fXI quando o plasma entra em contato com uma superfície carregada negativamente, constituindo a via de ativação por contato. Essa via ocorre com vidro ou caulim *in vitro* e é importante fisiologicamente quando o sangue entra em contato com uma superfície artificial como uma válvula cardíaca ou equipamento de hemodiálise (DAVIE *et al.*, 1991).

1.1.3 Regulação da coagulação sanguínea

A coagulação sanguínea é um processo finamente controlado por inibidores específicos para diferentes pontos da cascata. O balanço entre os fatores pró-coagulantes e anticoagulantes é essencial para o correto funcionamento do sistema hemostático em cada situação fisiológica.

A antitrombina III é um inibidor pertencente à classe das serpinas que bloqueia a atividade de trombina, fIXa, fXa, fXIa, fXIIa, caliceína e plasmina.

Sua atividade é dependente de heparina, ou glicosaminoglicanos sulfatados semelhantes à heparina, presente na superfície de células endoteliais e na matriz extracelular. Outras serpinas que atuam no controle da coagulação são o cofator II da heparina, que também requer glicosaminoglicanos sulfatados para exercer sua ação, a protease nexina 1 e a protease nexina 2 (BOMBELI *et al.*, 1997).

O inibidor da via extrínseca (TFPI) é uma proteína que apresenta três domínios tipo Kunitz. O TFPI inativa o complexo fVIIa-FT na ativação do fX por formar um complexo quaternário fVIIa/FT/fXa/TFPI, mas não bloqueia a ativação do fIX pelo complexo fVIIa-FT (DAVIE *et al.*, 1991).

Outro sistema modulador importante é o da proteína C ativada (APC). A via anticoagulante da APC é iniciada quando a trombina liga-se a trombosmodulina (TM), proteína transmembrana de células endoteliais. Essa ligação induz uma mudança conformacional na trombina alterando sua especificidade; o complexo trombina-TM agora reconhece e ativa a proteína C em APC (BOMBELI *et al.*, 1997). A APC hidrolisa os fatores não-enzimáticos Va e VIIIa de forma a inativá-los. Essa reação é acelerada na presença da proteína S, que age como um cofator não enzimático mediando a ligação da APC à membrana celular. O complexo trombina-TM também acelera a inativação da trombina por antitrombina III e ativa de forma mais eficiente o inibidor de fibrinólise ativado por trombina (TAFI) (ESMON, 2000).

1.1.4 Sistema fibrinolítico

A eliminação do coágulo sanguíneo é um passo essencial no processo de reparo tecidual. O sistema fibrinolítico é formado pela pró-enzima plasminogênio e sua forma ativa plasmina e seus ativadores e inibidores.

O plasminogênio é uma glicoproteína que apresenta cinco domínios *kringle*. O primeiro e o quarto domínio *kringle* contém sítios de ligação à lisina e são responsáveis pela interação com a fibrina, aumentando a eficiência da ativação do plasminogênio em plasmina, que cliva fibrina insolúvel em produtos de degradação solúveis (MEDVED e NIEUWENHUIZEN, 2003).

O ativador de plasminogênio tipo tecidual (t-PA) é uma serino-protease que também apresenta sítios de ligação à lisina, como o plasminogênio. Quando fibrina está presente, a formação de um complexo ternário fibrina/plasminogênio/t-PA aumenta a eficiência catalítica do t-PA. Outro ativador de plasminogênio é a uroquinase (u-PA), uma serino-protease que não interage com fibrina (DOBROVOLSKY e TITAEVA, 2002).

As enzimas que ativam plasminogênio são inibidas no sangue normal pelo inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1). A plasmina tem sua atividade regulada pelos inibidores α_2 -macroglobulina e a serpina α_2 -antiplasmina ou pelo inibidor de fibrinólise ativado por trombina (TAFI). O TAFI, ou procarboxipeptidase B, pode ser ativado por plasmina e pelo complexo trombina-TM e remove resíduos de lisina e arginina C-terminais expostos pela clivagem inicial da fibrina pela plasmina, impedindo assim a

ligação do t-PA e do plasminogênio à fibrina (DOBROVOLSKY e TITAEVA, 2002).

1.2 Trombina

A trombina é uma enzima multifuncional com um papel central na hemostasia. Além de sua função como principal agonista da agregação plaquetária e enzima-chave da cascata da coagulação, a trombina está envolvida em eventos celulares como quimiotaxia, proliferação, renovação da matriz extracelular e liberação de citocinas.

A ativação da protrombina pelo complexo da protrombinase ocorre em duas etapas dependentes de fosfolipídios. Primeiro a ligação Arg₃₂₀-Ile é hidrolisada formando o intermediário meizotrombina que é hidrolisado em Arg₂₇₁-Thr gerando α -trombina ativa (JENNY e MANN, 1998). A trombina, agora com 37 kDa, é liberada do complexo de membrana, enquanto os domínios Gla e *kringle* da protrombina permanecem ligados.

A estrutura da trombina humana consiste em uma cadeia A de 36 resíduos ligada por uma ponte dissulfeto a uma cadeia B de 259 resíduos, na qual a primeira tem uma função estrutural enquanto a segunda tem função catalítica. A trombina exibe o enovelamento característico das serino-proteases tipo tripsina, mas apresenta várias regiões características que regulam a interação com outras moléculas e contribuem para a alta especificidade da enzima (STUBBS e BODE, 1995).

A trombina é uma molécula globular de forma elipsóide que apresenta uma fenda estreita e profunda que abriga a tríade catalítica His57, Asp102 e Ser195. Essa fenda apresenta alças, em especial as chamadas “60” e “149”, que limitam o acesso de muitos substratos e inibidores macromoleculares (STUBBS e BODE, 1995). Além dessas alças, outra região importante para a interação com outras moléculas é um bolso hidrofóbico chamado “sítio ligante de arila” localizado a “oeste” do sítio S2 (os sítios S1, S2, etc. da protease reconhecem os resíduos P1, P2, etc. do substrato, que são os resíduos de aminoácidos no lado amino-terminal da ligação peptídica hidrolisada).

Uma das características mais marcantes da molécula de trombina é a distribuição peculiar de cargas na sua superfície. Embora seu ponto isoelétrico seja quase neutro, a trombina apresenta regiões ou pólos que concentram resíduos carregados. A fenda catalítica está cercada por resíduos negativos e esses por dois pólos positivos localizados a “leste” e a “norte”, referidos como exosítios (STUBBS e BODE, 1995). O pólo localizado a “leste” do sítio catalítico é chamado exosítio 1 ou exosítio de ligação ao fibrinogênio e é importante na interação da trombina com fibrinogênio, fibrina, trombosmodulina, PAR e hirudina. O outro pólo positivo, localizado a “norte” é chamado exosítio 2 ou exosítio de ligação à heparina e é importante na ligação com heparina e com o fragmento 2 da protrombina. Uma representação da estrutura tridimensional da trombina é mostrada na figura 2.

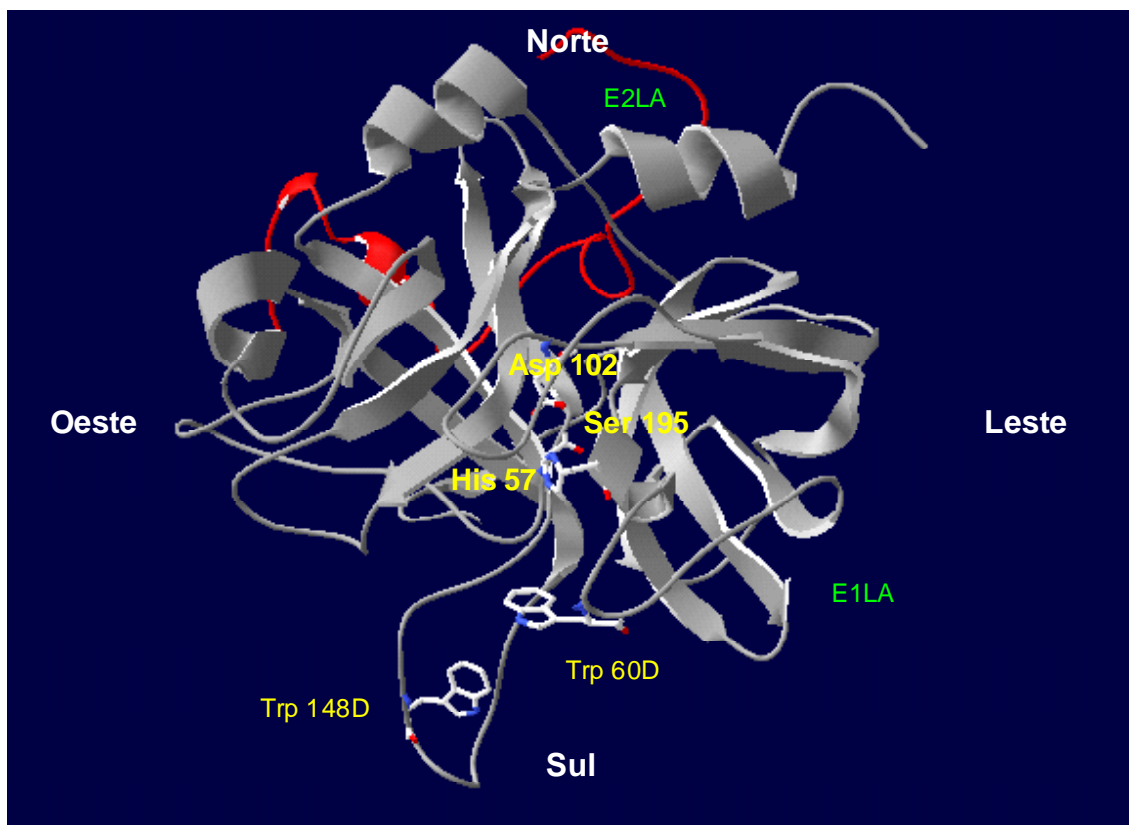


Figura 2: Representação em fita da estrutura tridimensional da trombina. A molécula está representada com a orientação convencional para trombina (STUBBS e BODE, 1995). Em vermelho, cadeia A; em cinza, cadeia B. E1LA, exosítio 1 (exosítio de ligação ao fibrinogênio); E2LA, exosítio 2 (exosítio de ligação à heparina). Figura gerada pelo prof. Hermes Amorim com o programa SPDBV (GUEx e PEITSCH, 1997).

Essas características estruturais únicas (fenda catalítica estreita, bolso hidrofóbico e exosítios positivos) contribuem para a grande especificidade da enzima e permitem uma fina modulação de sua atividade. Por exemplo, as regiões carregadas não têm uma função apenas como pólo eletrostático de interação com cargas opostas, mas são importantes na seleção e pré-orientação das moléculas nessa interação (STUBBS e BODE, 1995).

Como a tripsina, a trombina hidrolisa ligações peptídicas na extremidade carbóxi de resíduos básicos (P1), preferencialmente a arginina. A posição P1' é ocupada geralmente por um resíduo pequeno e hidrofílico como glicina ou serina. O resíduo que ocupa a posição P2 deve ser pequeno e hidrofóbico, como valina ou prolina, para ultrapassar a alça "60" e interagir com o bolso hidrofóbico próximo ao S2 (STUBBS e BODE, 1995). As posições P3 e P4 são ocupadas geralmente por resíduos pequenos e hidrofílicos ou grandes e hidrofóbicos, respectivamente. A seqüência reconhecida pela trombina no fibrinogênio é Leu-Asp-Pro-Arg↓Ser.

Tantos detalhes estruturais permitem a interação da trombina com uma grande diversidade de moléculas e faz dela uma enzima multifuncional. Além de seu papel mais importante na cascata da coagulação, o de converter fibrinogênio em fibrina, ela regula sua própria formação através da ativação dos fatores V, VIII, e XI (figura 1). Sua atividade é fundamental para a estabilização do coágulo (por ativar o fator XIII) e para evitar a degradação do mesmo (por ativar o TAFI).

Notavelmente, a trombina tem função anticoagulante regulando negativamente sua produção através da ativação da proteína C após a

formação do complexo trombina-TM, como já descrito. A base molecular proposta para explicar tal comportamento antagônico é a presença de duas formas distintas da molécula: uma forma “fast” pró-coagulante e uma forma “slow” anticoagulante. Essas formas estão em equilíbrio e a transição “fast” → “slow” é dependente da ligação do íon Na^{2+} com o sítio ligante de Na^{2+} na trombina, o que modula alostericamente a atividade catalítica (DANG *et al.*, 1995).

Os efeitos da trombina na hemostasia estendem-se ainda à reparação do dano tecidual. Ela está envolvida na resposta inflamatória estimulando quimiotaxia e adesão de células inflamatórias, atua na contração e remodelamento do tecido induzindo mudanças morfológicas em células endoteliais e fibroblastos e contribui para a regeneração do tecido lesado por estimular a proliferação celular tanto por efeito direto quanto induzindo a secreção de outros fatores de crescimento (GRAND *et al.*, 1996).

Esses efeitos celulares resultam de cascatas de transdução de sinal iniciadas com a ativação de um receptor de superfície pela trombina. Além das plaquetas, diversos tipos celulares expressam receptores de trombina: células endoteliais, macrófagos, monócitos, neutrófilos, fibroblastos, células epiteliais, células neurais e músculo liso (GRAND *et al.*, 1996).

Os receptores de trombina pertencem à família PAR (receptores ativados por protease) e são acoplados à proteína G, apresentando sete domínios transmembrana, a região C-terminal intracelular e uma longa cadeia extracelular N-terminal. Essa última região apresenta um sítio de clivagem para trombina (Leu-Asp-Pro-Arg↓Ser) e uma região de provável interação com

o exosítio 1 (GRAND *et al.*, 1996). O mecanismo de ativação desse receptor não é apenas por interação agonista-receptor. A trombina hidrolisa uma ligação peptídica na região extracelular N-terminal expondo uma nova seqüência de aminoácidos; essa nova seqüência age como agonista do receptor, ligando-se a ele e ativando-o (VU *et al.*, 1991).

1.3 Animais Hematófagos

1.3.1 Importância da saliva na hematofagia

Os animais que se alimentam com sangue deparam-se com os processos hemostáticos eficientes desenvolvidos pelos vertebrados e contorná-los é fundamental para o sucesso do parasitismo. Para isso, os animais hematófagos produzem uma diversidade de antagonistas, como antiplaquetários, anticoagulantes e vasodilatadores, e injetam-nos no hospedeiro durante a refeição, através da saliva. Alguns desses compostos salivares já foram descritos em estudos que demonstraram uma enorme variedade de estruturas e funções e a possibilidade do seu uso na terapêutica (MARWARDT, 1994; RIBEIRO, 1995). Dentre esses compostos, os principais anticoagulantes e antiplaquetários já estudados são apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Substâncias anti-hemostáticas isoladas de animais hematófagos.

Grupo	Espécie	Alvo	Nome	PM (kDa)	K _i	IC ₅₀	Referência
Carrapatos	<i>Boophilus microplus</i>	trombina	BmAP	60			HORN <i>et al.</i> , 2000
		trombina	microfilina	1,7			KOBE, 2002
		trombina	calcaratina	14,5			MOTOYASHIKI <i>et al.</i> , 2003
	<i>Ixodes ricinus</i>	fXa	ixodina				MARKWARDT, 1994
		trombina	ixina	7			HOFFMANN <i>et al.</i> , 1991
	<i>Ixodes scapularis</i>	VIIa/FT/fX(a)	ixolaris	16		30-420 pM	FRANCISCHETTI <i>et al.</i> , 2002
		via intrínseca		9,8			NARASIMHAN <i>et al.</i> , 2002
		fXa	Salp14	11,9			NARASIMHAN <i>et al.</i> , 2002
	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	trombina	madanina 1	6,8	25 nM		IWANAGA <i>et al.</i> , 2003
		trombina	madanina 2	7,1	34 nM		IWANAGA <i>et al.</i> , 2003
	<i>Dermacentor andersoni</i>	GP1IbIIIa	variabilina	5		157 nM	WANG <i>et al.</i> , 1996
	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	fXa		65			LIMO <i>et al.</i> , 1991
	<i>Amblyomma americanum</i>	trombina	americanina	12	73 pM		ZHU <i>et al.</i> , 1997b
	<i>Amblyomma hebraeum</i>	trombina	amblina	18	0,02 µM		LAI <i>et al.</i> , 2004
	<i>Hyalomma dromedarii</i>	trombina e fXa	F6	0,72	66 nM;		IBRAHIM <i>et al.</i> , 2001
					134 nM		
	<i>Hyalomma truncatum</i>	fXa		17	0,7 nM		JOUBERT <i>et al.</i> , 1995
	<i>Ornithodoros moubata</i>	fXa	TAP	6,8	0,6 nM		WAXMAN <i>et al.</i> , 1990
		plaqueta	moubatina	17		50 nM	WAXMAN e CONNOLLY, 1993
trombina		ornitodorina		1 pM		VAN DE LOCHT <i>et al.</i> , 1996	
<i>Ornithodoros savignyi</i>	fXa		12	0,8 nM		GASPAR <i>et al.</i> , 1996	
	trombina	savignina	12	4,9 pM		NIENABER <i>et al.</i> , 1999	
	fosfolipídios	BSAP1	9,3			EHEBAUER <i>et al.</i> , 2002	
	fosfolipídios	BSAP2	9,1			EHEBAUER <i>et al.</i> , 2002	
	fXa		35,5			STARK; JAMES, 1995	
Mosquitos	<i>Aedes aegypti</i>	fXa		35,5			STARK; JAMES, 1995
	<i>Anopheles albimanus</i>	trombina	anofelina	6,5	5,9 pM		VALENZUELA <i>et al.</i> , 1999
	<i>Anopheles stephensi</i>	trombina		45			WAIKHET-KOUADIO <i>et al.</i> , 1998
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	PAF		40-50			RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2001
	<i>Culicoides variipennis</i>	fXa		28			PEREZ DE LEON <i>et al.</i> , 1998
	<i>Lutzomyia longipalpis</i>						CHARLAB <i>et al.</i> , 1999
<i>Simulium vittatum</i>	fXa			18		JACOBS <i>et al.</i> , 1990	

(continua)

Tabela 1: continuação

Grupo	Espécie	Alvo	Nome	PM (kDa)	K _i	IC ₅₀	Referência
Moscas	<i>Chrysops spp.</i>	GP1IbIIIa	crisoptina	65	95 pM		REDDY <i>et al.</i> , 2000
	<i>Glossina morsitans</i>	trombina	TTI	3,5	0,6 pM		CAPPELLO <i>et al.</i> , 1996
	<i>Haematobia irritans</i>	trombina	trombostasina	9,2			ZHANG <i>et al.</i> , 2002
Barbeiros	<i>Cimex lectularius</i>	tenase (fVIII, fIXa, PL)		17			VALENZUELA <i>et al.</i> , 1996
	<i>Rhodnius prolixus</i>	trombina	rodhina (prolixina-G)	11	0,2 pM		FRIEDRICH <i>et al.</i> , 1993
		fVIII	nitroforina (prolixina-S)	2			RIBEIRO <i>et al.</i> , 1995
	<i>Triatoma pallidipennis</i>	ADP	RPAI	19			FRANCISCHETTI <i>et al.</i> , 2000
		trombina	triabina	20	3 pM		NOESKE-JUNGBLUT <i>et al.</i> , 1995
plaqueta		palidipina	20			NOESKE-JUNGBLUT <i>et al.</i> , 1994	
Sanguessugas	<i>Haementeria ghilianii</i>	fibrinogênio	hementina	82			SWADESH <i>et al.</i> , 1990
		fXIIIa	tridegina	7,3		9,2 nM	FINNEY <i>et al.</i> , 1997
	<i>Haementeria officinalis</i>	fXa	antistasina	17	0,5 nM		TUSZYNSKI <i>et al.</i> , 1987
		plaqueta	LAPP	16		60 nM	CONNOLLY <i>et al.</i> , 1992
	<i>Hirudo medicinalis</i>	trombina	hirudina	7			SALZET, 2001
	<i>Macrobodella decora</i>	GP1Ib-IIIa	decorsina	4,4		1,5 nM	SEYMOUR <i>et al.</i> , 1990
<i>Theromyzon tessulatum</i>	trombina	teromina	14,5	12 fM		SALZET <i>et al.</i> , 2000	
	fXa	terostasina	9	34 pM		CHOPIN <i>et al.</i> , 2000	
	fXa	AcAP	8,7		336 pM	CAPPELLO <i>et al.</i> , 1995	
Ancilóstomas	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	fXa	AceAP	9,6		HARRISON <i>et al.</i> , 2002	
Morcegos	<i>Desmodus rotundus</i>	fXa	draculina	88,5	15 nM		FERNANDEZ <i>et al.</i> , 1999
		plasminogênio	DSPA	44			GARDELLE <i>et al.</i> , 1989

O estudo dessas substâncias enfrenta empecilhos como a quantidade muito pequena na qual estão presentes na saliva (ou glândula salivar) e a dificuldade na obtenção da amostra ou dos animais. Tais obstáculos estão sendo superados com a evolução das técnicas de análise em química de proteínas e o desenvolvimento de novas técnicas em biologia molecular. Essas últimas permitem a determinação de “salivomas”, definido como o conjunto das informações carregadas pelos mRNA e das proteínas expressas em glândula salivar (RIBEIRO e FRANCISCHETTI, 2002), já disponíveis para o barbeiro *Rhodnius prolixus* (RIBEIRO *et al.*, 2004a), o carrapato *Ixodes scapularis* (VALENZUELA *et al.*, 2002a) e os mosquitos *Culex pipiens quinquefasciatus* (RIBEIRO *et al.*, 2004b), *Anopheles stephensi* (VALENZUELA *et al.*, 2003) e *Aedes aegypti* (VALENZUELA *et al.*, 2002b).

O estudo da composição da saliva disponibiliza novas moléculas com potencial uso terapêutico. Muitos compostos isolados de animais hematófagos, ou análogos desenhados a partir deles, têm sido testados para o desenvolvimento de drogas mais específicas e seguras, com menos efeitos colaterais sistêmicos, como hipotensão e prolongamento do tempo de sangramento. A utilidade terapêutica é confirmada pelos estudos pré-clínicos e clínicos de algumas destas moléculas, especialmente a hirudina e o TAP (GLADWELL, 2002; SCHAFFER *et al.*, 1991).

Além do uso terapêutico, componentes salivares talvez possam ser utilizados em vacinas contra o parasita, já que muitos deles causam prejuízos importantes pela espoliação direta ou pela transmissão de agentes infecciosos. O desenvolvimento de vacinas contra ectoparasitas é uma

alternativa atraente ao controle químico devido à especificidade, à ausência de resíduos nos produtos de origem animal e à longevidade potencial do controle, levando-se em conta que têm aumentado os problemas de resistência a inseticidas/acaricidas, juntamente com a preocupação com a contaminação química do ambiente e dos produtos alimentícios (KAY e KEMP, 1994).

1.3.2 Anticoagulantes e antiplaquetários salivares

A maioria dos anticoagulantes salivares estudados até o momento são inibidores peptídicos ou protéicos dirigidos contra os fatores da via comum da cascata da coagulação, fator Xa e trombina. Outros alvos são a *tenase* intrínseca inibida pela nitroforina-2 (RIBEIRO *et al.*, 1995), o complexo fVIIa/FT inibido pelo ixolaris (FRANCISCHETTI *et al.*, 2002), os fatores V e VII inibidos pela saliva de *Dermacentor andersoni* (GORDON e ALLEN, 1991) e o fator XIIIa inibido pela tridegina (FINNEY *et al.*, 1997).

Entre os inibidores de trombina estão a anofelina, peptídeo de 6,5 kDa isolado de *Anopheles albimanus* (FRANCISCHETTI *et al.*, 1999), a americanina de *Amblyomma americanum* (ZHU *et al.*, 1997) e o TTI (*tsetse thrombin inhibitor*), peptídeo de 3,5 kDa expresso em glândula salivar e intestino de *Glossina morsitans morsitans* (CAPPELLO *et al.*, 1998). A mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*, produz um inibidor de trombina chamado trombostasina que está sendo testada como alvo numa vacina contra o inseto (ZHANG *et al.*, 2002, CUPP *et al.*, 2004).

A triabina foi isolada do barbeiro *Triatoma pallidipennis*, tem 20 kDa e é muito potente, com constante de inibição de 3 pM. Ela interage exclusivamente com o exosítio I da trombina conforme estudos de cristalografia (NOESKE-JUNGBLUT *et al.*, 1995, FUENTES-PRIOR *et al.*, 1997).

A hirudina é o anticoagulante salivar de sanguessuga mais estudado até hoje. É um peptídeo de 7 kDa com a porção N-terminal globular e fortemente compacta e a C-terminal linear e com numerosos resíduos carregados negativamente. Esses últimos resíduos de aminoácidos interagem com o exosítio I da trombina, enquanto os resíduos da porção N-terminal interagem com o sítio catalítico (NASKI *et al.*, 1990). O estudo das características da ligação da hirudina à trombina levou ao desenvolvimento de pequenos compostos sintéticos contendo apenas os domínios necessários para ligação à trombina (MARAGANORE *et al.*, 1990). Um desses compostos, a bivalirudina (originalmente nomeada hirulog) tem sido investigada em muitos estudos clínicos e foi aprovada para uso como anticoagulante em angioplastia coronariana nos Estados Unidos e Nova Zelândia (GLADWELL, 2002).

O BmAP (*Boophilus microplus Anticoagulant Protein*) foi isolado da saliva do carrapato *Boophilus microplus*. É uma proteína de 60 kDa que apresenta IC₅₀ de 100 nM e interage com a trombina ligando-se ao sítio ativo e, provavelmente, ao exosítio I (HORN *et al.*, 2000). De extratos de corpo inteiro de fêmeas adultas de *B. microplus* foi caracterizada a bofilina, inibidor tipo Kunitz de 13,9 kDa que interage tanto com o sítio catalítico quanto com o

exosítio I (PEREIRA, 1999). A calcaratina é um inibidor de trombina encontrado na saliva de *Boophilus calcaratus* (MOTOYASHIKI *et al.*, 2003).

Outro alvo comum dos anticoagulantes é o fXa. A saliva de *Rhipicephalus appendiculatus* (LIMO *et al.*, 1991) e *Desmodus rotundus* (FERNANDEZ *et al.*, 1999) apresentam inibidores de fXa de alta massa molecular. Já a antistasina, isolada de *Haementeria officinalis*, é uma proteína de 17 kDa que, além da atividade anticoagulante, apresenta também ação antimetastática (TUSZYNSKI *et al.*, 1987).

Alguns animais apresentam anticoagulantes direcionados tanto contra o fXa como contra a trombina, como os carrapatos *Ornithodoros moubata* e *O. savignyi*. A saliva de *O. moubata* contém o inibidor de trombina ornitodorina (VAN DE LOCHT *et al.*, 1996) e o inibidor de fXa TAP (*Tick Anticoagulant Peptide*), um peptídeo inibidor de fXa de 6,8 kDa potente ($K_i = 1 \text{ pM}$) e seletivo (WAXMAN *et al.*, 1990). Esses inibidores são homólogos àqueles encontrados em *O. savignyi*: savignina, inibidor de trombina (NIENABER *et al.*, 1999) e um inibidor de fXa (GASPAR *et al.*, 1996).

Os inibidores da agregação plaquetária encontrados em animais hematófagos agem de diversas maneiras. Os RPAI-1 e RPAI-2 (*Rhodnius prolixus Aggregation Inhibitor*) encontrados em *R. prolixus* são lipocalinas, proteínas dotadas de uma cavidade adaptada para ligar pequenas moléculas, no caso ADP (FRANCISCHETTI *et al.*, 2000). Um mecanismo encontrado mais freqüentemente é o bloqueio do receptor plaquetário de fibrinogênio GPIIb/IIIa como no caso da crisoptina (REDDY *et al.*, 2000), variabilina (WANG *et al.*, 1996) e decorsina (SEYMOUR *et al.*, 1990). Outros inibidores agem

somente sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno como a moubatina (WAXMAN e CONNOLLY, 1993), o LAPP (*Leech Antiplatelet Protein*) (CONNOLLY *et al.*, 1992) e a palidipina (NOESKE-JUNGBLUT *et al.*, 1994).

Estudos mais recentes têm demonstrado que a atividade anticoagulante da saliva pode ser atribuída não a uma única molécula mas a famílias de proteínas/peptídios. Esse é o caso dos carrapatos *Haemaphysalis longicornis*, com as mandaninas inibidoras de trombina (IWANAGA *et al.*, 2003), e *Ixodes scapularis*, com peptídios inibidores de fXa (NARASIMHAN *et al.*, 2002).

Em embrião do carrapato *Hyalomma dromedarii* foram encontrados seis peptídios anticoagulantes de massas moleculares variando entre 390 e 790 Da (IBRAHIM *et al.*, 1998). O mais potente deles, com massa de 720 Da e denominado de F6, foi caracterizado como inibidor de trombina e de fXa (IBRAHIM *et al.*, 2001). Este é o menor peptídio inibidor de trombina já descoberto. As enzimas da coagulação inibida pelos demais peptídios não foram identificadas.

1.4 Carrapato bovino

O carrapato *Boophilus microplus* CANESTRINI, 1887 (Acari: Ixodidae) é um ectoparasita de bovinos, embora outros animais como ovelha, cavalo, veado, cão, cabra e homem possam ser hospedeiros em épocas de grande infestação nas pastagens (ROCHA, 1998). É originário da Ásia e atualmente

está distribuído entre os paralelos 32°N e 32°S, ocorrendo na Austrália, Oriente, sul e leste da África e nas Américas, exceto nos Estados Unidos de onde foi erradicado (GONZÁLES, 2002).

A importância desse parasita vem das grandes perdas econômicas que causa, chegando a quase 1 bilhão de dólares por ano no Brasil (DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 2000). Além dos prejuízos diretos pela queda na produção de leite e carne e na qualidade do couro, o *B. microplus* transmite os agentes da tristeza parasitária bovina, os protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e a riquetsia *Anaplasma marginale*. São também importantes os prejuízos relacionados ao controle do parasita, como os custos de mão-de-obra, das instalações e equipamentos para aplicação de carrapaticidas e das drogas utilizadas para esse fim (CORDOVÉS, 1997).

1.4.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida *B. microplus* compreende uma fase de vida livre e uma fase de vida parasitária na qual utiliza um único hospedeiro. Um resumo do ciclo de vida está representado na figura 3.

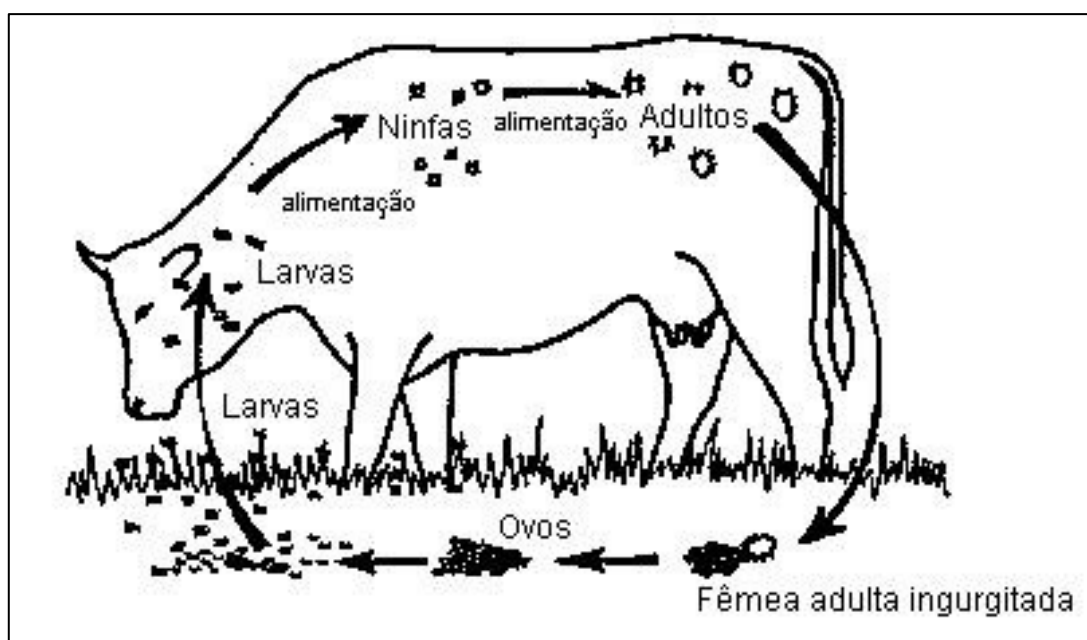


Figura 3: Esquema do ciclo de vida do *B. microplus*. Na fase parasitária, o carrapato está sobre o hospedeiro e passa pelos estágios de larva, ninfa e adulto. Na fase de vida livre, o parasita está no ambiente sob a forma de ovos e larvas.

A fase de vida livre inicia com a queda da teleógina ou fêmea adulta completamente ingurgitada. Após uma fase de pré-postura de aproximadamente 3 dias, ocorre a ovopostura que dura em torno de 17 dias. Cada fêmea produz de 2000 a 3000 ovos. A eclosão das larvas ocorre após 22 a 30 dias. As larvas precisam de um período de 4 a 20 dias para tornarem-se larvas infestantes, que esperam o hospedeiro na parte superior das pastagens. O tempo de vida livre varia entre 28 e 51 dias, podendo durar mais de 300 dias, já que as larvas podem ficar um longo tempo sem se alimentar. A fase de vida livre é intensamente afetada pelas condições ambientais e climáticas (ROCHA, 1998).

A fase parasitária dura de 18 a 26 dias e corresponde ao período em que o carrapato está sobre o hospedeiro. A larva infestante instala-se no bovino e em torno de 5 dias transforma-se em metalarva. No 8º dia desde o início da infestação, em média, a metalarva torna-se ninfa e esta se torna metaninfa depois de mais 5 dias. Nessa fase ocorre a diferenciação sexual. No 14º dia, em média, a metaninfa torna-se neandro (macho jovem) e esse torna-se gonandro (macho adulto) em 2 dias. O gonandro não se alimenta, permanece no bovino e acasala-se com várias fêmeas. A metaninfa torna-se neógina (fêmea jovem) no 17º dia, em média, passando a partenógina (fêmea parcialmente ingurgitada) em 3 dias e a teleógina em 2 dias (ROCHA, 1998). O final da fase parasitária ocorre entre o 20º e 23º dia da infestação, quando as fêmeas completamente ingurgitadas (teleóginas) caem ao solo. As fêmeas ingerem cerca de 3 mL de sangue durante sua passagem pelo hospedeiro e transformam 60% da sua massa corporal em ovos (GONZÁLES, 2002).

1.4.2 Controle do parasita

O principal meio de controle do carrapato ainda é o uso de acaricidas sintéticos. Os primeiros acaricidas a serem utilizados foram os arsenicais em 1896. Com a dispersão da resistência a esses compostos, novas drogas passaram a ser usadas: organoclorados (DDT, BHC), organofosforados (coumafos), carbamatos, piretróides (permetrina, decametrina, deltametrina), formamidinas (amitraz), benzoil-fenil-uréia (fluazuron) (GEORGE, 2000). Os compostos mais utilizados atualmente são formamidinas, benzoil-fenil-uréia, piretróides e ivermectinas, embora os organofosforados ainda sejam usados (GOMES, 1998).

Além da contaminação do ambiente e dos produtos pecuários, outro grande problema no uso de acaricidas sintéticos é o desenvolvimento de resistência. Populações resistentes começam a aparecer em aproximadamente uma década após a introdução de cada acaricida exigindo o desenvolvimento de novos princípios ativos (DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 2000).

Devido aos problemas relacionados com o uso de acaricidas, novas estratégias de controle do carrapato têm sido estudadas, principalmente o controle biológico e o controle imunológico.

Os principais agentes estudados como controle biológico são os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (FRAZZON *et al.*, 2000). O fungo *M. anisopliae* age sobre teleóginas, ovos e larvas, observando-se

mortalidade e redução na postura e eclosão das larvas (BITTENCOURT, 2000).

Os estudos voltados para o controle imunológico foram os que obtiveram melhores resultados. Duas vacinas foram desenvolvidas baseadas na proteína Bm86, uma glicoproteína localizada na superfície de células digestivas do intestino do carrapato (WILLADSEN, 1997). A proteína Bm86 é considerada um antígeno oculto, ou seja, um antígeno que não entra em contato com o sistema imunológico do hospedeiro numa infestação natural mas é capaz de induzir resposta imune quando inoculado artificialmente no hospedeiro (DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 2000).

Uma das vacinas, a Gavac (Heber Biotec SA, Cuba), utiliza a proteína recombinante produzida em *Pichia pastoris* e apresenta eficácia de 55 a 100% no controle de infestações de *B. microplus* em Cuba, Brasil, Argentina e México (DE LA FUENTE *et al.*, 1999). A TickGARD (Division of Tropical Animal Production and Biotech, Australia) utiliza a proteína recombinante produzida em *Escherichia coli* e já passou por uma alteração na formulação dando origem à TickGARD-Plus, que reduz em 56% o número de carrapatos após uma geração (JONSSON *et al.*, 2000). Os efeitos da vacina são atribuídos a lesões do trato digestivo do parasita (WILLADSEN, 1997).

Outras proteínas têm sido testadas como antígeno, como a Bm91 (RIDING *et al.*, 1994) e a Bm95 (DE LA FUENTE *et al.*, 2000). Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado na identificação e caracterização de antígenos que possam ser usados numa vacina contra o carrapato. Uma dessas proteínas é a BYC (*Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D), o precursor de uma

aspartico-protease isolada de embrião de *B. microplus* (LOGULLO *et al.*, 1998). A imunização de bovinos com a BYC induziu uma proteção de 14 a 36% devida principalmente a efeitos sobre o trato reprodutivo (DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 1998).

Outros antígenos testados foram os BmTIs (*Boophilus microplus trypsin inhibitors*), inibidores de serino-proteases (elastase, calicreína e tripsina) de 6-18 kDa isolados de larvas de *B. microplus* (SASAKI *et al.*, 2004). A imunização com BmTIs reduziu em 70% o número de carrapatos e em 71% o peso dos ovos, provavelmente por interferir na fixação das larvas e na alimentação do parasita (ANDREOTTI *et al.*, 2002).

A eficácia destes antígenos, entretanto, está muito aquém da necessária para o controle do carrapato e novos antígenos devem ser procurados. Dentro desta perspectiva, uma abordagem é a identificação e caracterização de componentes de sistemas fisiológicos importantes para a vida do carrapato. Nosso grupo de pesquisa vêm investindo no estudo dos mecanismos anti-hemostáticos presentes na saliva do carrapato. Este trabalho pretende aumentar o conhecimento sobre esses mecanismos caracterizando um novo anticoagulante salivar, a microfilina.

2 OBJETIVOS

Purificação, caracterização molecular e funcional do inibidor de trombina da saliva de *B. microplus*, a microfilina. Para atingir esses objetivos foram realizadas as seguintes etapas:

1. Purificar a microfilina;
2. Determinar sua massa molecular;
3. Confirmar sua natureza protéica e determinar a composição mínima de aminoácidos;
4. Caracterizar sua atividade inibitória sobre a ação da trombina sobre seus substratos naturais fibrinogênio e receptor plaquetário;
5. Caracterizar sua ação sobre a atividade amidolítica da trombina sobre substratos sintéticos (Abz-LDPRSFRLRNKNDKYEPFWEDEENKQ-EDDnp e S2238);
6. Determinar o modo de interação do inibidor com a trombina;
7. Testar sua especificidade;
8. Testar sua estabilidade térmica.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Neste trabalho foram utilizados reagentes de grau analítico e água Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA) para o preparo das soluções. Trombina foi purificada de plasma bovino como descrito em Ding e Xu (1995). PPACK foi adquirido da Bachem (Bubendorf, Suíça) e a Sepharose ativada com brometo de cianogênio (CNBr-activated Sepharose 4B) adquirida de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Inglaterra). O ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, fibrinogênio, albumina sérica bovina (BSA) e as enzimas quimiotripsina, tripsina, fator Xa, plasmina, proteína C ativada e uroquinase foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os substratos cromogênicos S2238 (H-D-PhePip-Arg-pNA), S2222 (N-Bz-Ile- γ Glu-Gly-Arg-pNA), S-2251 (H-D-Val-Leu-Lis-pNA), S-2366 (piroGlu-Pro-Arg-pNA) e S-2444 (piroGlu-Gly-Arg-pNA) foram adquiridos da Chromogenix (Milão, Itália); suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA e BAPNA (Bz-Arg-pNA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O substrato fluorogênico Abz-LDPRSFRLRNKNDKYEPFWEDEENKQ-EDDnp foi sintetizado pelo prof. Dr. Luiz Juliano, da Universidade Federal de São Paulo.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção de carrapatos

Dezesseis bovinos, adquiridos em zona livre de *B. microplus* (Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul), foram mantidos confinados em baias individuais na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Uma vez por mês esses bovinos foram infestados com larvas de *B. microplus*. Após a queda, as teleóginas foram coletadas e lavadas.

3.2.2 Obtenção de saliva

As teleóginas foram fixadas em placa de vidro com fita adesiva e foram induzidas a salivar com uma injeção de 5 μ L de pilocarpina 2% na parte posterior do corpo (figura 4). As gotículas de saliva (aproximadamente 1 μ L por carrapato) foram coletadas através de um sistema de capilares acoplados a um tubo plástico e a uma bomba de vácuo em um período de até 2 h após a indução. Após a coleta, a saliva foi armazenada a -20°C até o uso.



Figura 4: Coleta de saliva de *B. microplus*. (A) Teleóginas fixadas em placa de vidro após injeção com pilocarpina. (B) Uma teleógina com uma gotícula de saliva no aparelho bucal (seta).

3.2.3 Purificação da microfilina

3.2.3.1 Cromatografia de gel filtração

Saliva bruta (100 μ L) foi aplicada em coluna GS2000W (LKB UltroPack 0,75 X 30 cm, LKB, Bromma, Suécia) pré-equilibrada em $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 20 mM pH 6,0 num fluxo de 0,5 mL/min a temperatura ambiente. As frações coletadas (1,0 mL) foram concentradas por liofilização em Centrivap (Labconco, Kansas, EUA) e testadas quanto à atividade anticoagulante pelo ensaio de tempo de recalcificação (ver item 3.2.6.1). A atividade anticoagulante relativa foi calculada por comparação do prolongamento do tempo de coagulação de cada fração com as frações de maior atividade (100%).

3.2.3.2 Ultrafiltração em membrana de exclusão de 3 kDa

As frações relativas ao segundo pico de atividade anticoagulante provenientes da cromatografia de gel filtração foram misturadas e ultrafiltradas em Centricon-3 (Amicon, Millipore, Bedford, EUA) por centrifugação a 5000 g por 2 h. O concentrado foi acrescido de 3 mL de água milli-Q e novamente centrifugado, sendo esse procedimento repetido mais uma vez. O ultrafiltrado, que contém a microfilina, foi concentrado cinco vezes por liofilização.

3.2.3.3 Cromatografia de afinidade trombina-Sepharose

A resina trombina-Sepharose foi preparada por acoplamento de trombina bovina à Sepharose ativada com brometo de cianogênio (CNBr-activated Sepharose 4B). Trombina bovina (27 mg) foi incubada com seu inibidor irreversível H-D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona (PPACK), em excesso molar de duas vezes, por 2 h a temperatura ambiente. À resina Sepharose ativada com CNBr (5 mL) foi ligada a trombina tratada com PPACK por 2,5 h a temperatura ambiente em tampão NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 NaCl 0,5 M e depois bloqueada com etanolamina 1 M pH 8,0.

A microfilina semipurificada por ultrafiltração foi diluída quatro vezes em Tris 20 mM pH 7,5 e aplicada na coluna de afinidade trombina-Sepharose pré-equilibrada com o mesmo tampão num fluxo de 0,5 mL/min. A resina foi desempacotada e incubada com a amostra por 2,5 h a temperatura ambiente e com agitação suave. Após esse período a resina foi novamente empacotada e o não-retido foi lavado com tampão de equilíbrio (frações 1-7). O retido foi eluído com Tris 20 mM pH 7,5 contendo NaCl 1 M e coletado em frações de 1,5 mL (frações 8-14). As frações foram dialisadas contra água, concentradas por liofilização e testadas no ensaio de coagulação do fibrinogênio.

3.2.3.4 Medida de proteína

A quantidade de proteína foi estimada pela medida da absorvância no comprimento de onda de 280 nm. Cem microlitros de amostra foram submetidos à medida em microplaca de quartzo de 96 poços em espectrofotômetro SpectraMax (MolecularDevices, Sunnyvale, EUA) e o valor da absorvância normalizado para caminho óptico de 1,0 cm.

3.2.4 Espectrometria de massas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas em um espectrômetro de massa da marca Micromass (Manchester, Inglaterra), modelo TofSpec SE, dotado de tecnologia MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight). Para as análises de massa, a matriz empregada foi o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. A amostra é submetida a análise utilizando polaridade positiva, modo refletômetro e aceleração da amostra fragmentada utilizando uma tensão de 20.000 Volts.

3.2.5 Análise de aminoácidos

A determinação da composição de aminoácidos baseia-se no método descrito por Bidlingmeyer (1984). A amostra de microfilina (18 μ g) foi submetida à hidrólise em HCl 6 N contendo fenol 0,1% a temperatura constante de 110°C por 22 h. Após, foi neutralizada e incubada com solução

de derivação água:metanol:triethylamina:fenilisotiocianato (7:1:1:1, v:v:v:v) por 20 min a temperatura ambiente. A separação dos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aminoácidos) foi realizada em coluna de fase reversa (Picotag C18 3,9 x 1,5 mm, Waters, Medford, EUA) em sistema HPLC (Milton Roy, Ivyland, EUA). As soluções utilizadas foram CH₃COONa 0,14 M pH 5,6 contendo acetonitrila 5% (solução A) e solução aquosa de acetonitrila 60% v:v (solução B); os PTC-aminoácidos foram eluídos num gradiente crescente de 10 a 54% da solução B num fluxo de 1,0 mL/min. A quantificação foi baseada na comparação entre a área dos picos e o tempo de retenção com padrões de cada aminoácido tratados da mesma forma que a amostra.

3.2.6 Caracterização da atividade da microfilina

Os ensaios de atividade foram feitos em microplaca de 96 poços com volume de reação de 100 µL. As medidas de absorbância e fluorescência foram realizadas em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA) ou fluorímetro FMax (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA), respectivamente, equipados com software para aquisição dos dados (SOFTMax PRO, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Os resultados apresentados são representativos de três a cinco repetições.

3.2.6.1 Ensaio de tempo de recalcificação

Plasma bovino (20 μ L), coletado em citrato trissódico 0,4% (p:v), foi pré-incubado com as frações coletadas da gel filtração em HEPES 10 mM pH 7,4 por 15 min a 37°C. A coagulação foi iniciada com a adição de CaCl_2 40 mM com NaCl 150 mM e foi acompanhada pela medida da absorbância no comprimento de onda 650 nm (A_{650}) em intervalos de 11 s. O tempo gasto para atingir absorbância de 0,06 foi considerado o tempo de recalcificação por corresponder ao ponto de inflexão da curva sigmóide da coagulação do plasma sem inibidor.

3.2.6.2 Ensaio de coagulação do fibrinogênio

Trombina (20 nM) foi pré-incubada com microfilina (0,53, 1,06, 2,11, 4,22 ou 8,45 μ M) por 10 min a 37°C em tampão Tris 50 mM pH 7,5 com BSA 0,1%. Após esse tempo a reação foi iniciada com a adição de 200 μ g de fibrinogênio e foi acompanhada pela medida da absorbância no comprimento de onda 650 nm (A_{650}) em intervalos de 11 s durante 25 min. A atividade residual da trombina foi calculada considerando-se como 100% a velocidade inicial da reação na ausência de microfilina (controle).

3.2.6.3 Ensaio com substrato cromogênico

Trombina (4,8 nM) foi pré-incubada com microfilina (25,5 ou 51 μ M) por 10 min a 37°C em tampão Tris 50 mM pH 7,5 com NaCl 150 mM e CaCl₂ 10 mM. Após esse tempo a reação foi iniciada com a adição de substrato cromogênico específico para trombina S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, 200 μ M). A liberação de p-nitroanilina foi acompanhada pela medida da absorbância no comprimento de onda 405 nm (A_{405}) em intervalos de 11 s durante 40 min.

3.2.6.4 Ensaio com substrato fluorogênico

Trombina (4,8 nM) foi incubada com microfilina (10,2, 20,4, 30,6 ou 40,8 μ M) em tampão Tris 50 mM pH 7,5 com NaCl 150 mM e CaCl₂ 10 mM por 10 min a 37°C. A reação foi iniciada com a adição do substrato fluorogênico Abz-LDPRSFRLRNKNDKYEPFWEDEENKQ-EDDnp (14 μ M) e foi acompanhada pela medida da fluorescência (em unidades relativas de fluorescência, RFU) emitida no comprimento de onda 430 nm após excitação no comprimento de onda 320 nm em intervalos de 30 s durante 1 h. A atividade residual da trombina foi calculada considerando-se como 100% a velocidade inicial da reação na ausência de microfilina (controle).

3.2.6.5 Ensaio de agregação plaquetária

Sangue de coelho coletado em citrato trissódico 0,4% (p:v) foi centrifugado por 10 min a 1000 rpm a temperatura ambiente. O plasma rico em plaquetas foi separado e centrifugado nas mesmas condições. As plaquetas sedimentadas foram ressuspensas cuidadosamente em solução de Tyrode (HEPES 5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaHCO₃ 12 mM, Na₂HPO₄ 0,42 mM, MgCl₂ 1 mM, glicose 0,1% e BSA 0,25%), sendo esse procedimento repetido duas vezes. As plaquetas lavadas (50 µL, A₆₅₀ = 0,150) foram induzidas a agregar com trombina (0,5 nM) previamente incubada por 10 min a 37°C com diferentes quantidades de microfilina (0,24, 1,69, 3,38, 6,76 ou 10,14 µM). A agregação plaquetária foi monitorada pela redução da absorbância no comprimento de onda 650 nm (A₆₅₀) durante 20 min em intervalos de 11 s.

3.2.6.6 Teste de estabilidade térmica

Amostras de microfilina (2,7 µg) foram incubadas por 30 min a 23°C ou 37°C ou por 5 min a 100°C. Após esse tempo, essas amostras foram testadas no ensaio de coagulação do fibrinogênio.

3.2.6.7 Ação sobre outras enzimas

A especificidade da microfilina foi testada frente a seis serino-proteases: quimiotripsina (0,5 nM), tripsina (100 nM), fator Xa (0,001 U), plasmina (1,5 nM), proteína C ativada (16 nM) e uroquinase (1,2 μ M). Cada uma dessas enzimas foi pré-incubada com microfilina (20,4 μ M para fXa, excesso molar de 100 vezes para as outras enzimas) por 30 min a 37°C em tampão Tris 50 mM pH 7,5 com NaCl 150 mM e BSA 0,1%. Após esse tempo a reação enzimática foi iniciada com a adição de substrato cromogênico específico para cada enzima (200 μ M suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA/quimiotripsina, 200 μ M BAPNA/tripsina, 200 μ M S-2222/fator Xa, 200 μ M S-2251/plasmina, 200 μ M S-2366/proteína C ativada, 200 μ M S-2444/uroquinase). A liberação de p-nitroanilina foi acompanhada pela medida da absorbância no comprimento de onda de 405 nm (A_{405}) em intervalos de 30 s durante 1 h. A atividade das enzimas na presença de microfilina foi comparada com a atividade na ausência do inibidor (controle).

4 RESULTADOS

4.1 Purificação da microfilina

A saliva de *B. microplus* contém duas atividades anticoagulantes que foram separadas por cromatografia de gel filtração, mostrada na figura 5. A primeira atividade tem massa molecular de 60 kDa e corresponde ao inibidor de trombina denominado BmAP (HORN, 2000). A segunda atividade elui em um volume correspondente a uma massa molecular aparente de 35 kDa e foi nomeada microfilina (KOBÉ, 2002).

A microfilina foi purificada por ultrafiltração em membrana de exclusão de 3000 Da e cromatografia de afinidade trombina-Sepharose. As frações correspondentes ao segundo pico de atividade anticoagulante foram ultrafiltradas em Centricon-3 e a atividade anticoagulante foi encontrada no ultrafiltrado, indicando que a microfilina tem massa molecular menor que 3 kDa. O inibidor foi purificado dessa fração por cromatografia em resina de afinidade trombina-Sepharose. A figura 6 mostra que a atividade inibitória fica retida na coluna e é eluída com 1 M de NaCl.

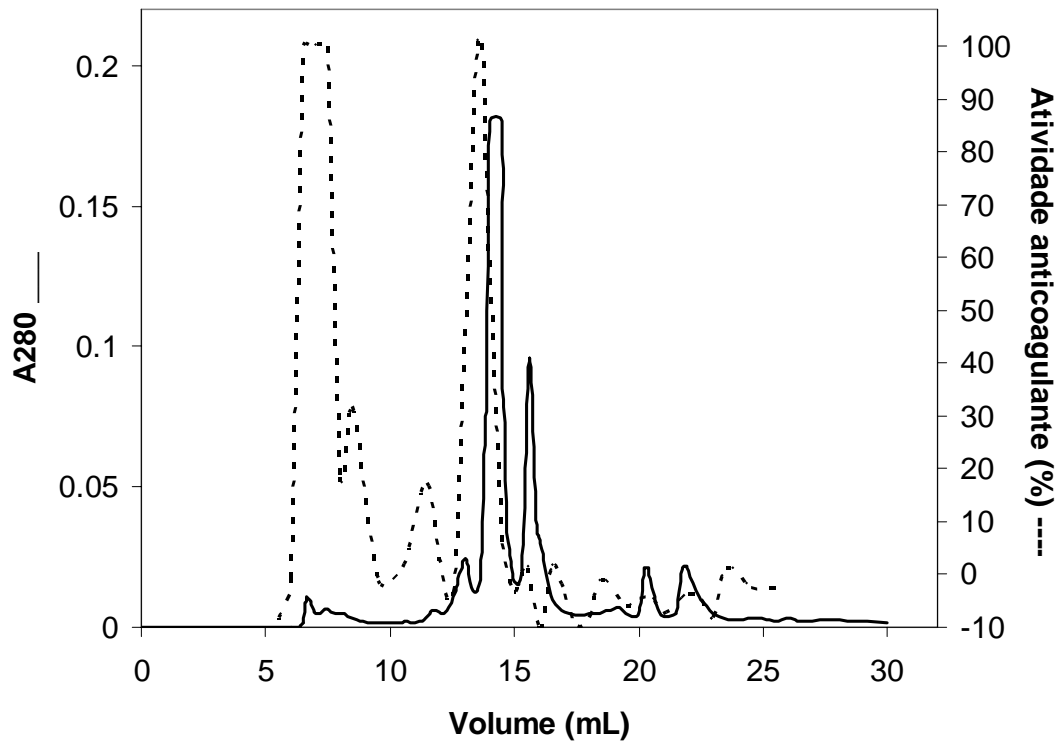


Figura 5: Cromatografia de gel filtração. Saliva bruta (100 μ L) foi aplicada em coluna GS2000W pré-equilibrada em acetato de amônio 20 mM pH 6,0 num fluxo de 0,5 mL/min. A concentração de proteína foi monitorada pela absorvância em 280 nm (linha contínua), e a atividade pelo ensaio de tempo de recalcificação (linha tracejada).

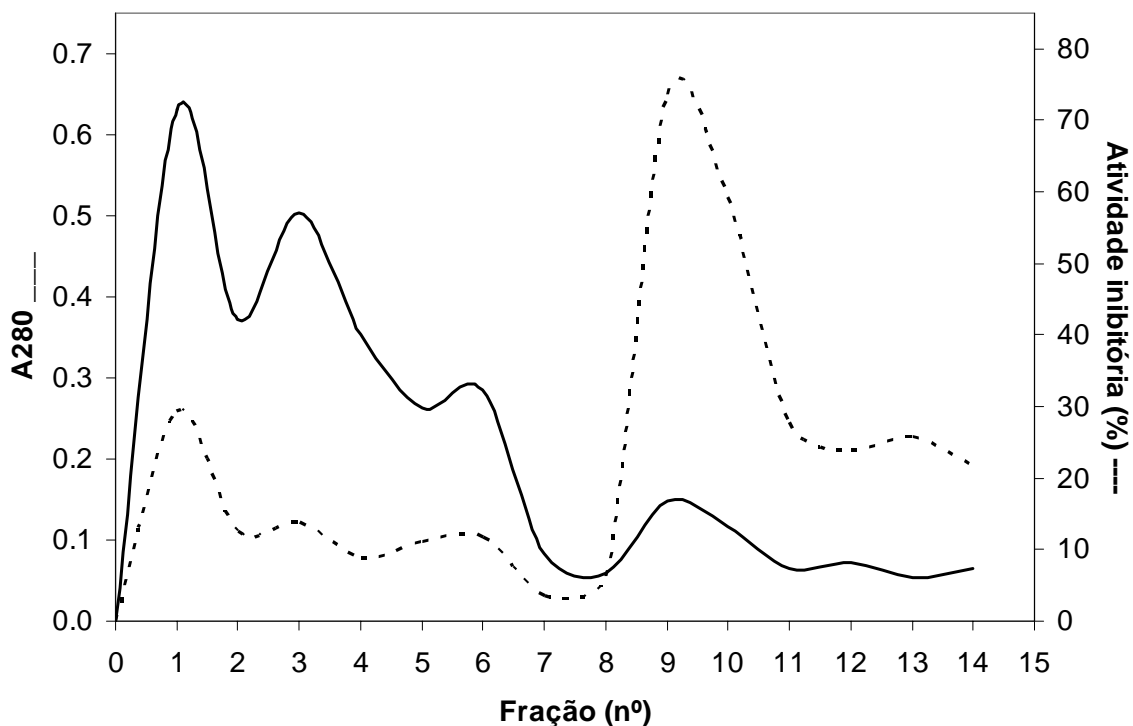


Figura 6: Cromatografia de afinidade trombina-Sepharose. Microfilina parcialmente purificada diluída em Tris 20 mM pH 7,5 foi aplicada em trombina-Sepharose pré-equilibrada num fluxo de 0,5 mL/min. Após 2,5 h, a resina foi lavada com tampão de equilíbrio (frações 1 a 7) e o retido foi eluído com Tris 20 mM pH 7,5 contendo NaCl 1 M (frações 8 a 14). A concentração de proteína foi monitorada pela absorbância em 280 nm (linha contínua), e a atividade pelo ensaio de coagulação do fibrinogênio (linha tracejada).

4.2 Determinação da massa molecular

A pureza da microfilina eluída da trombina-Sepharose foi confirmada por espectrometria de massas por MALDI-TOF. O espectro de massas (figura 7) mostra dois picos de massas 1756 e 1770 Da, confirmando a massa pequena da molécula. Esta diferença pode ser devida à isoformas da molécula, por exemplo com a substituição de um resíduo de aspartato por um de glutamato ou de uma asparagina por uma glutamina ou lisina, o que altera a massa em 14 Da.

4.3 Análise de aminoácidos

Para melhor caracterizar o inibidor, sua composição mínima de aminoácidos foi determinada (tabela 2). A microfilina apresenta 16 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular mínima calculada de 1731,91 Da. Esta massa é próxima à massa molecular medida por espectrometria de massas, confirmando a composição de aminoácidos da microfilina. A diferença encontrada em relação à medida da espectrometria de massas pode ser devida ao efeito de ionização e ligação com algum íon, por exemplo o cálcio (massa molar de 40 Da). Com efeito, a microfilina apresenta uma grande proporção de aminoácidos ácidos (6 aminoácidos em um total de 16 aminoácidos) e pode ser um ligante de Ca^{2+} .

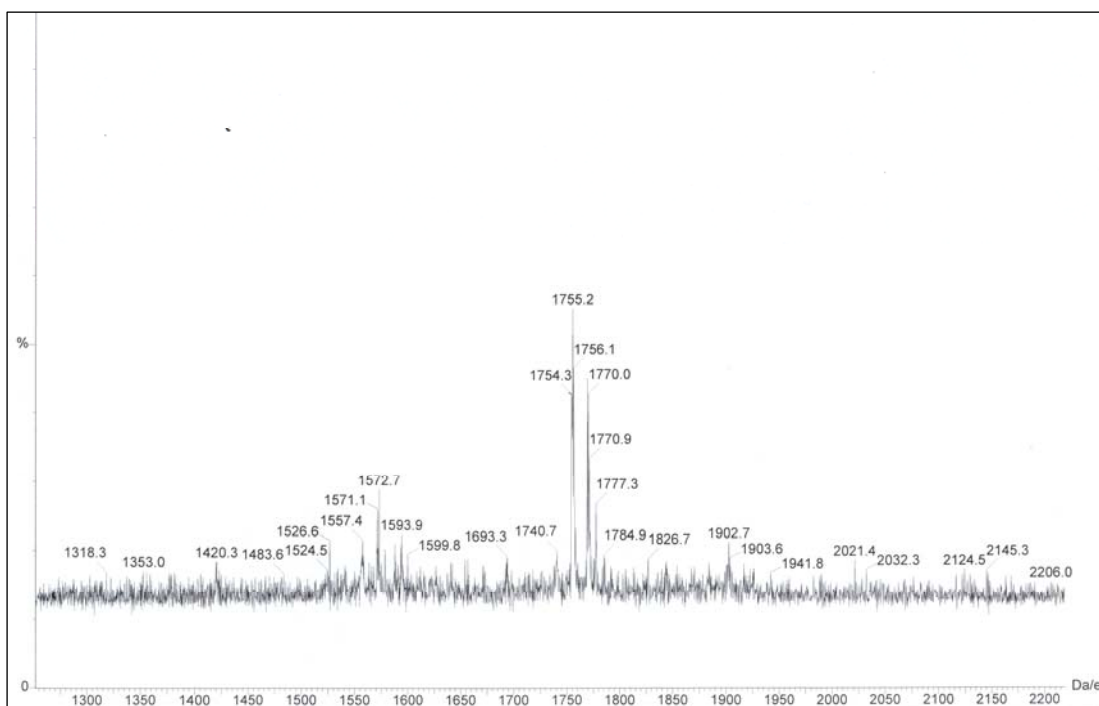


Figura 7: Espectrometria de massas MALDI-TOF. A análise foi realizada em espectrômetro de massa Micromass TofSpec SE utilizando polaridade positiva, modo refletômetro e tensão de 20.000 Volts.

Tabela 2: Composição mínima de aminoácidos da microfilina.

AMINOÁCIDO	RAZÃO MOLAR
Aspartato	3
Glutamato	3
Arginina	1
Lisina	1
Alanina	4
Valina	1
Isoleucina	1
Leucina	1
Serina	1
Glicina	-
Histidina	-
Treonina	-
Metionina	-
Prolina	-
Fenilalanina	-
Tirosina	-
Triptofano*	-
Cisteína*	-

*Cisteína e triptofano não podem ser determinados por essa técnica.

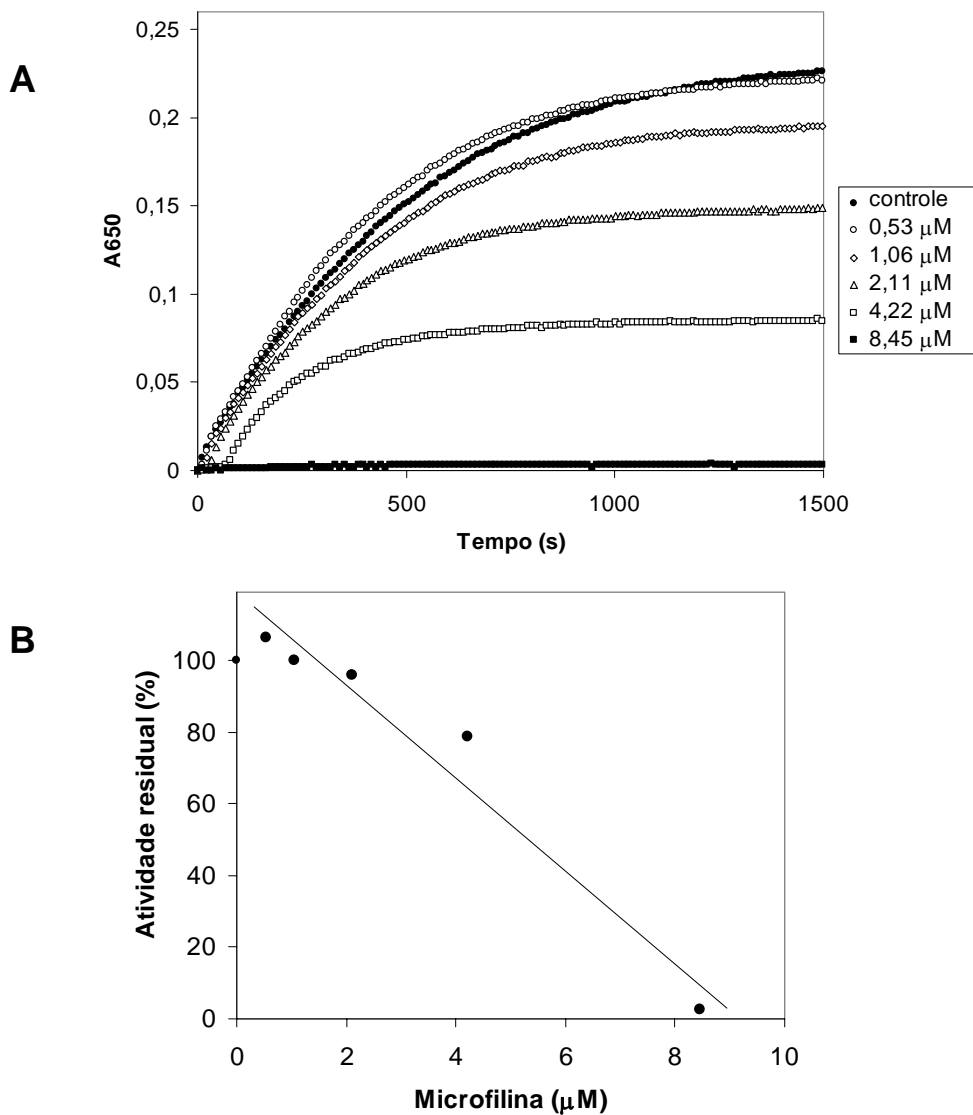
4.4 Caracterização da atividade da microfilina

4.4.1 Inibição da atividade da trombina sobre fibrinogênio

A atividade da microfilina sobre a enzima-chave da coagulação sanguínea, a trombina, foi caracterizada. A microfilina inibe a atividade da trombina sobre fibrinogênio, seu substrato natural, de maneira dose dependente, como mostrado na figura 8A. A curva dose-resposta fornece o valor de IC₅₀ de 5,3 μM para a microfilina (figura 8B).

4.4.2 Efeito da microfilina na atividade da trombina sobre substratos sintéticos

A ação da microfilina sobre a hidrólise do substrato sintético curto específico para trombina (S2238) foi avaliada. A figura 9 mostra que a microfilina não é capaz de inibir a atividade amidolítica mesmo em concentrações cinco vezes maiores do que aquelas requeridas para inibir a trombina no ensaio de coagulação do fibrinogênio. Esse resultado sugere que a microfilina não interage com o sítio catalítico da enzima.



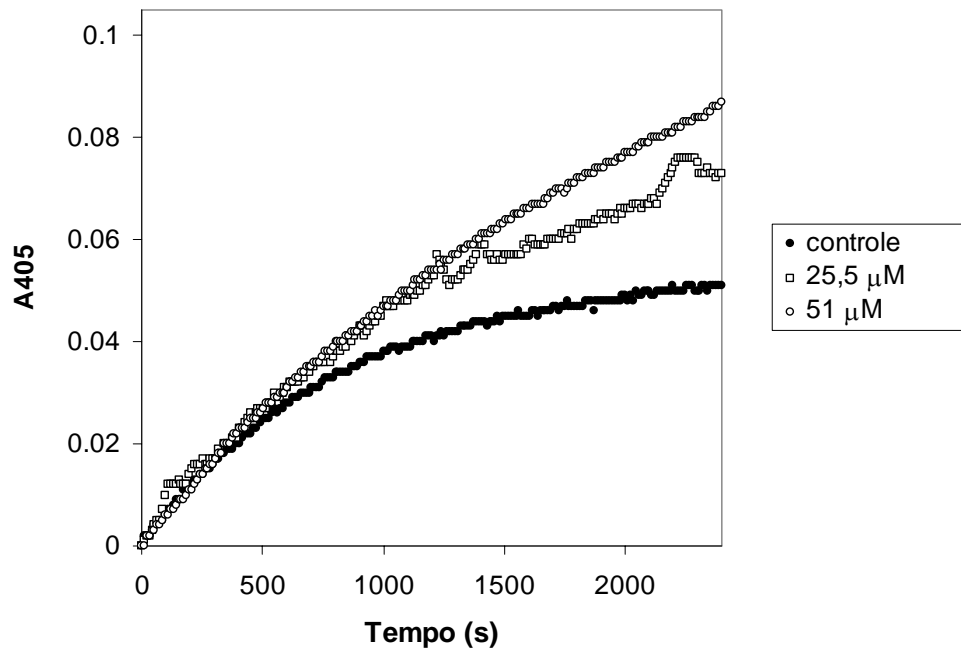


Figura 9: Efeito da microfilinga sobre a hidrólise de substrato sintético curto pela trombina. Trombina (4,8 nM) foi pré-incubada com microfilinga (25,5 ou 51 μM) por 10 min a 37°C em Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl_2 10 mM. S2238 (D-Fen-Pip-Arg-pNA, 200 μM) foi adicionado e a reação foi acompanhada pelo aumento na absorbância em 405 nm.

Para testar se a microfilina interage com o exosítio I da trombina, a enzima foi testada com um substrato sintético longo. A seqüência de aminoácidos deste substrato foi desenhada especialmente para interagir com o sítio catalítico da trombina e com seu exosítio I. O resultado (figura 10A) mostra que a microfilina foi capaz de inibir a hidrólise desse substrato pela trombina de forma dose dependente com IC_{50} de 42,3 μ M (figura 10B).

4.4.3 Inibição da agregação plaquetária induzida por trombina

Além da atividade sobre substratos peptídicos e protéicos, foi testada também a atividade da trombina sobre receptor celular de plaquetas na presença da microfilina. A inibição da agregação plaquetária pela microfilina é mostrada na figura 11A. A curva dose-resposta fornece o valor de IC_{50} de 5,8 μ M (figura 11B).

4.5 Estabilidade térmica do peptídeo

A estabilidade térmica da microfilina foi testada em duas temperaturas, 37°C e 100°C. O resultado (figura 12) mostra que o peptídeo é resistente à temperatura, pois mesmo após fervura a atividade antitrombina permaneceu.

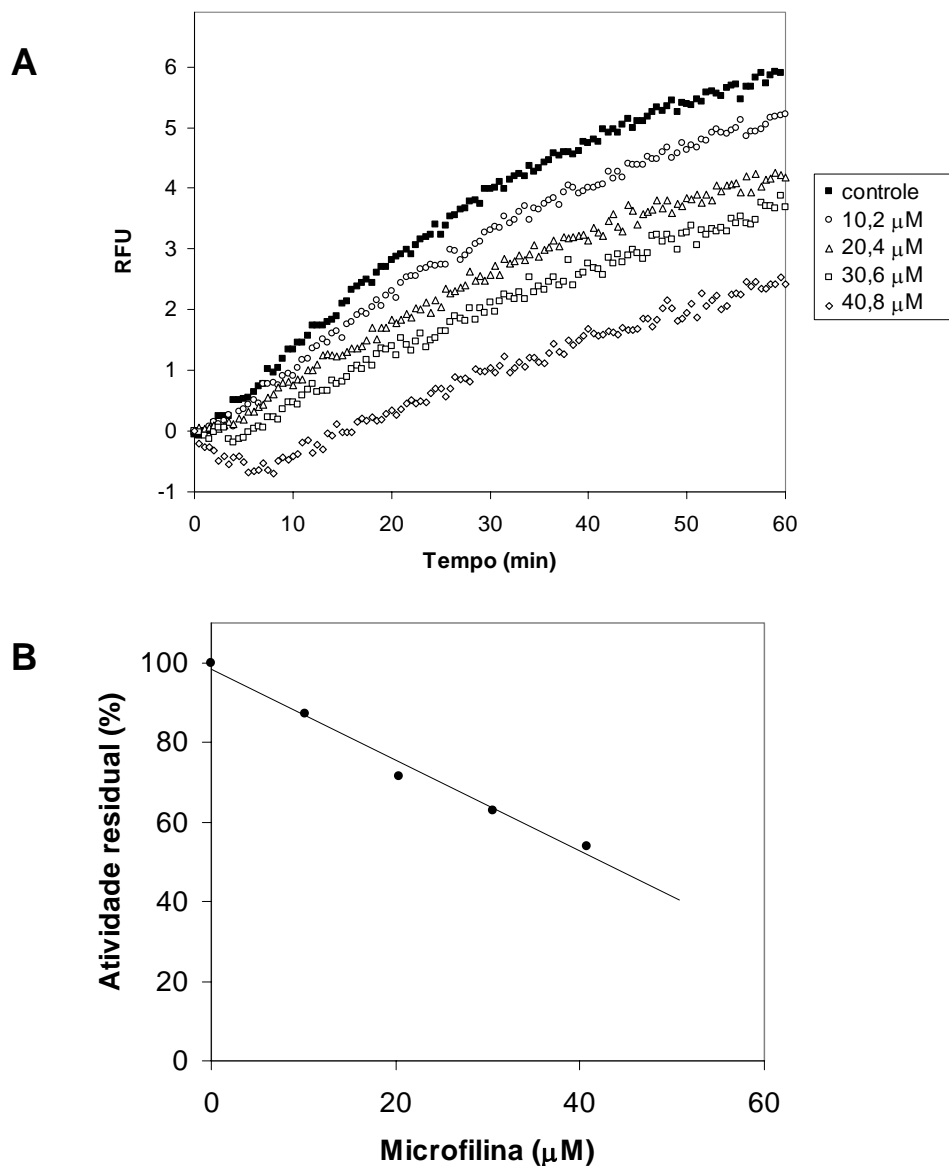


Figura 10: Efeito da microfilina sobre a hidrólise de substrato sintético longo pela trombina. (A) Trombina (4,8 nM) foi incubada com microfilina (10,2, 20,4, 30,6 ou 40,8 μM) em Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl_2 10 mM por 10 min a 37°C . O substrato fluorogênico Abz-LDPRSFRLRNKNDKYEPFWE-DEENKQ-EDDnp (14 μM) foi adicionado e a reação foi acompanhada pelo aumento da fluorescência em 430 nm após excitação em 320 nm. (B) Curva dose-resposta da microfilina (dados de (A)). A atividade residual da trombina foi calculada considerando-se como 100% a velocidade inicial da reação na ausência do inibidor (controle).

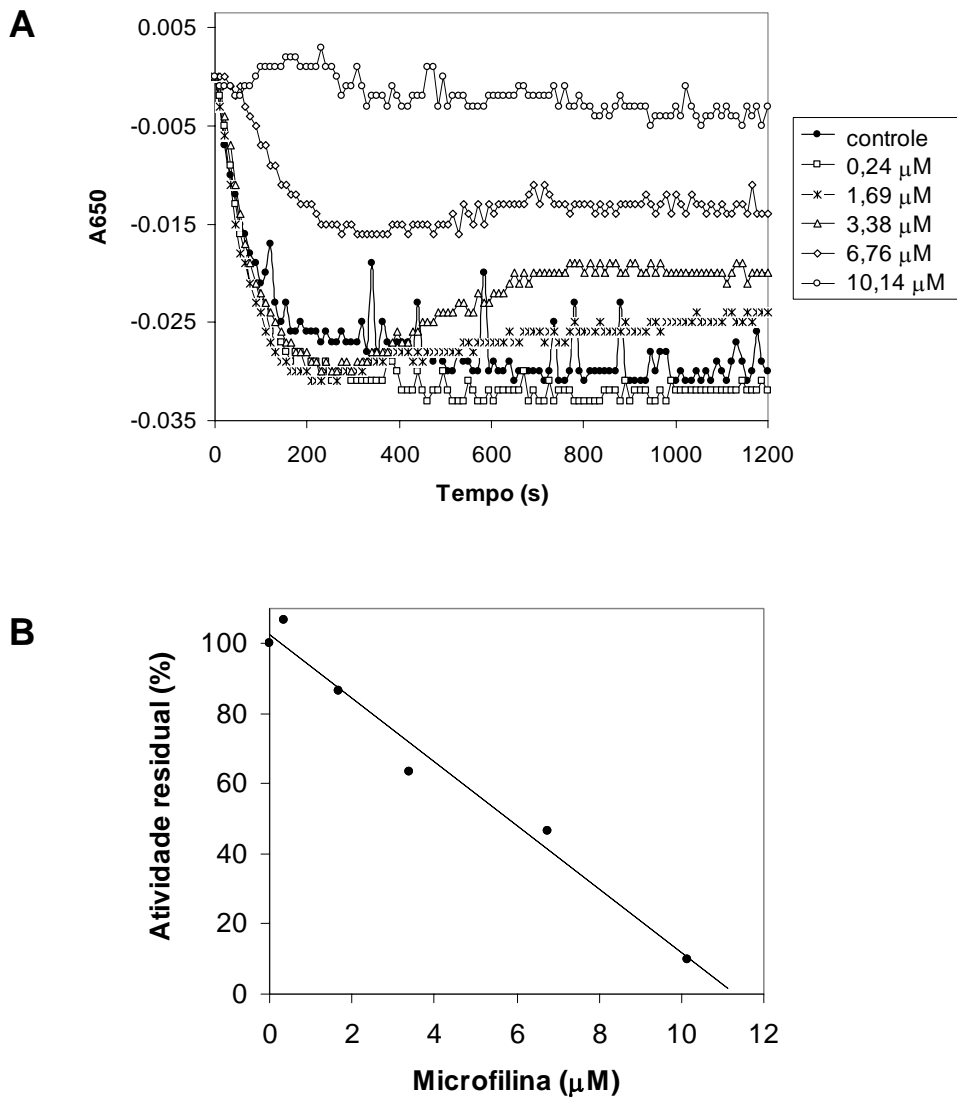


Figura 11: Inibição da agregação plaquetária induzida por trombina pela microfilina. (A) Plaquetas de coelho foram induzidas a agregar com trombina (0,5 nM) previamente incubada por 10 min a 37°C com microfilina (0,24, 1,69, 3,38, 6,76 ou 10,14 μM). A agregação plaquetária foi monitorada pela redução da absorbância em 650 nm. (B) Curva dose-resposta da microfilina (dados de (A)). Atividade residual da trombina foi calculada considerando-se como 100% a velocidade inicial da reação na ausência do inibidor (controle).

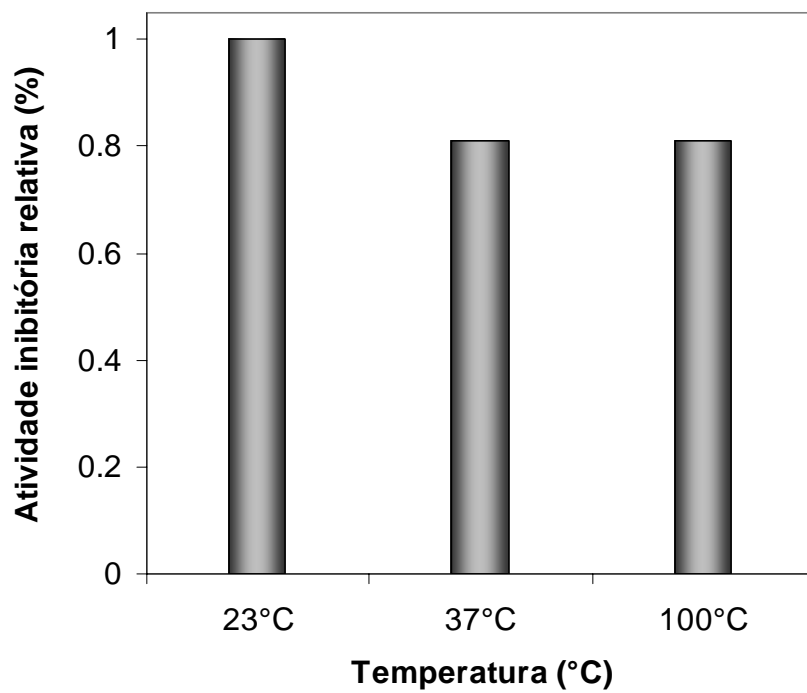


Figura 12: Teste de estabilidade térmica da microfilina. Microfilina (2,7 μg) foi incubada por 30 min a 23°C ou 37°C ou por 5 min a 100°C e depois testada no ensaio de coagulação do fibrinogênio.

4.6 Ação sobre outras enzimas

A especificidade do inibidor foi testada frente a seis serino-proteases: fator Xa (figura 13), plasmina (figura 14), proteína C ativada (figura 15), uroquinase (figura 16), tripsina (figura 17) e quimiotripsina (figura 18). A microfilina não inibiu a atividade de nenhuma dessas enzimas sobre seus substratos sintéticos específicos nas condições experimentais.

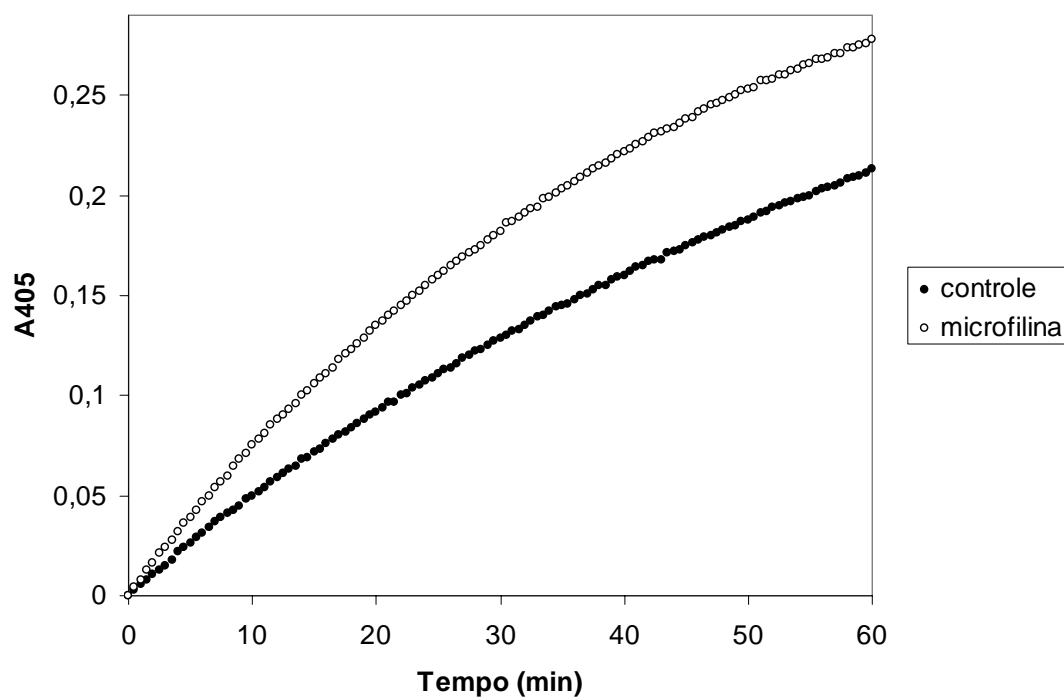


Figura 13: Efeito da microfilina sobre a atividade amilolítica do fator Xa. Fator Xa (0,001 U) foi pré-incubado com microfilina (20,4 μ M) por 30 min a 37°C em Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, BSA 0,1%. O substrato cromogênico S-2222 (200 μ M) foi adicionado e a reação foi acompanhada pelo aumento na absorbância em 405 nm.

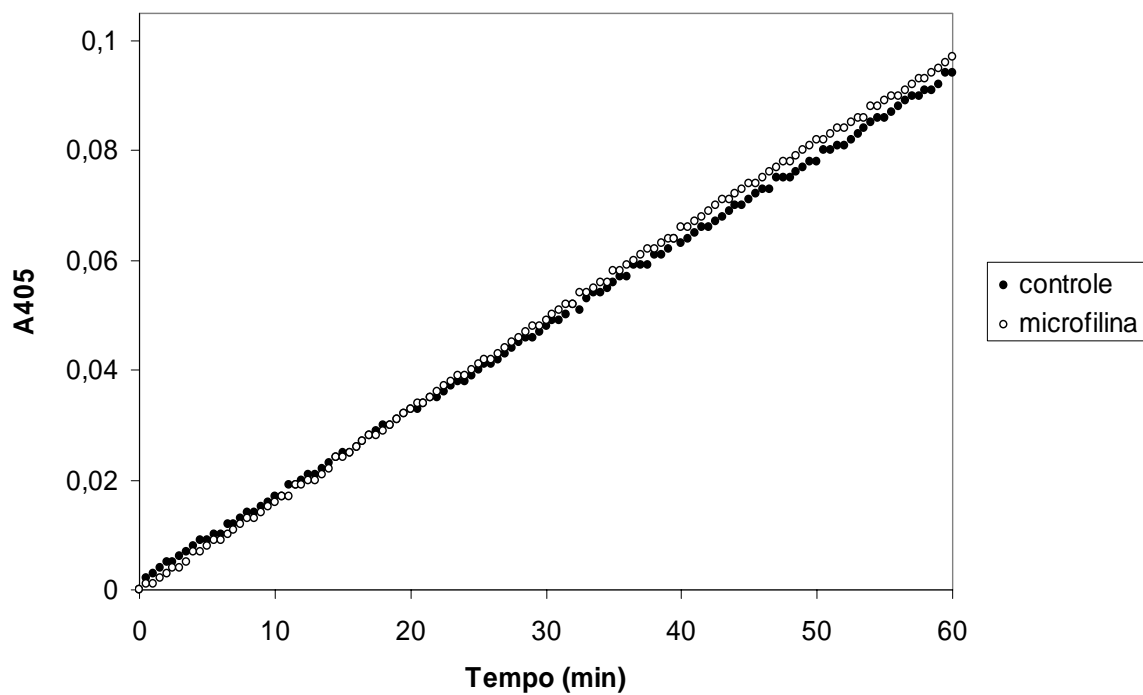


Figura 14: Efeito da microfilina sobre a atividade amidolítica da plasmina. Plasmina (1,5 nM) foi pré-incubada com microfilina (150 nM) por 30 min a 37°C em Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, BSA 0,1%. O substrato cromogênico S-2251 (200 μ M) foi adicionado e a reação foi acompanhada pelo aumento na absorbância em 405 nm.

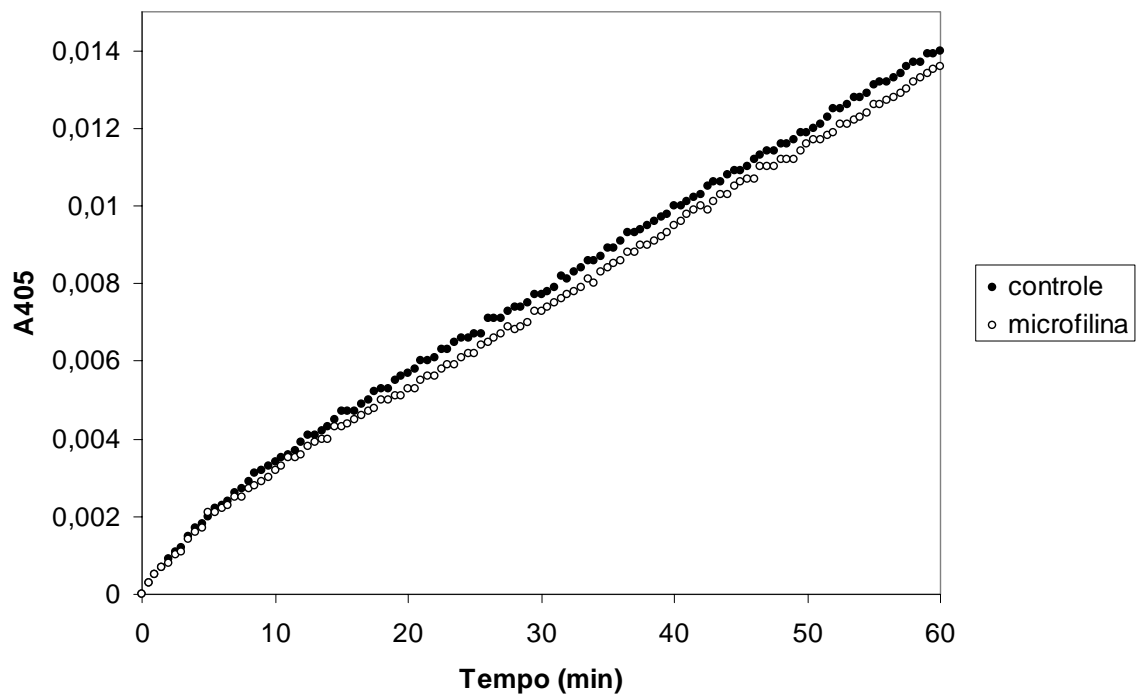


Figura 15: Efeito da microfilina sobre a atividade amidolítica da proteína C ativada. Proteína C ativada (16 nM) foi pré-incubada com microfilina (1,6 μ M) por 30 min a 37°C em Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, BSA 0,1%. O substrato cromogênico S-2366 (200 μ M) foi adicionado e a reação foi acompanhada pelo aumento na absorvância em 405 nm.

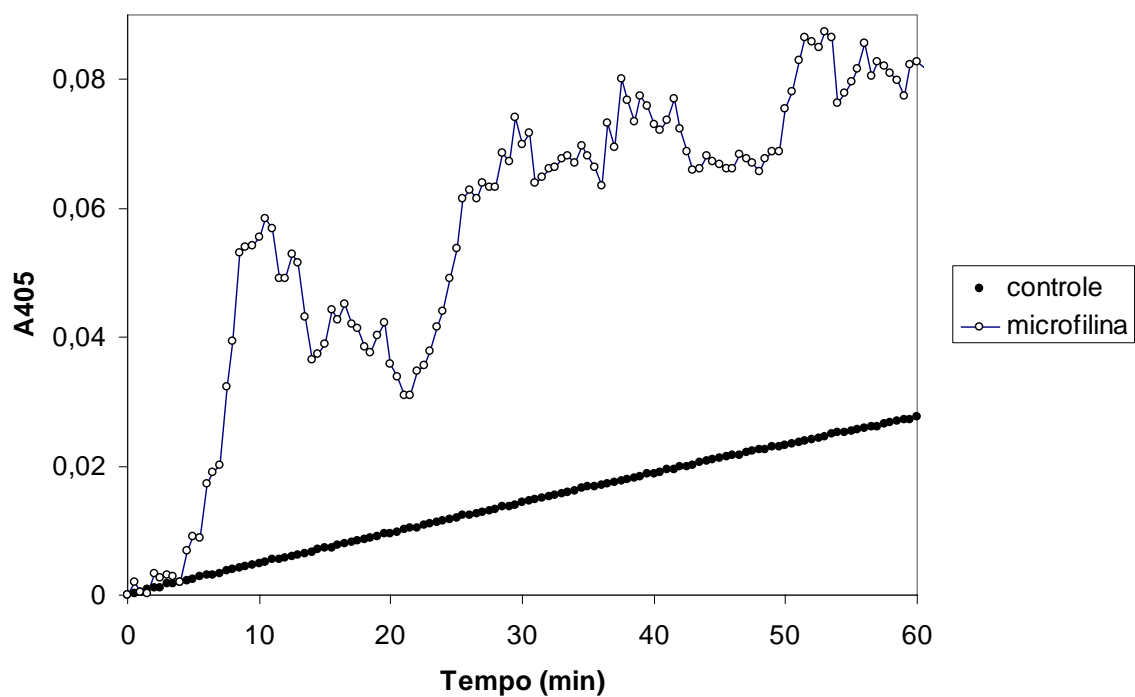


Figura 16: Efeito da microfilina sobre a atividade amidolítica da uroquinase. Uroquinase (1,2 μM) foi pré-incubada com microfilina (120 μM) por 30 min a 37°C em Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, BSA 0,1%. O substrato cromogênico S-2444 (200 μM) foi adicionado e a reação foi acompanhada pelo aumento na absorbância em 405 nm.

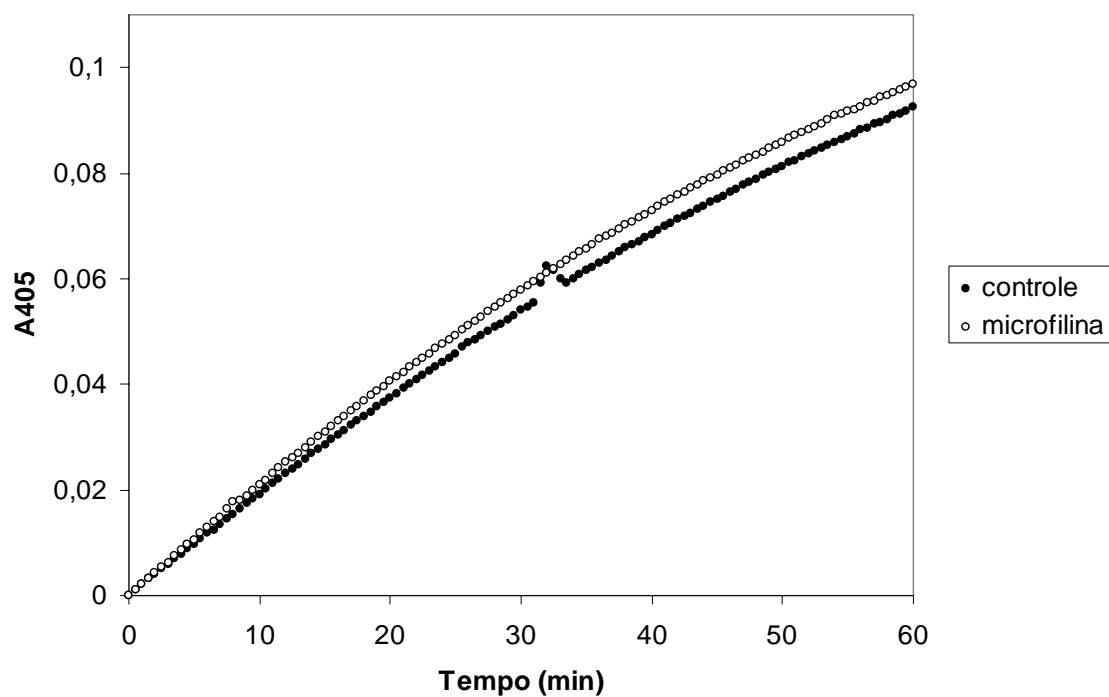


Figura 17: Efeito da microfilina sobre a atividade amidolítica da tripsina. Tripsina (100 nM) foi pré-incubada com microfilina (10 μ M) por 30 min a 37°C em Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, BSA 0,1%. O substrato cromogênico BAPNA (200 μ M) foi adicionado e a reação foi acompanhada pelo aumento na absorbância em 405 nm.

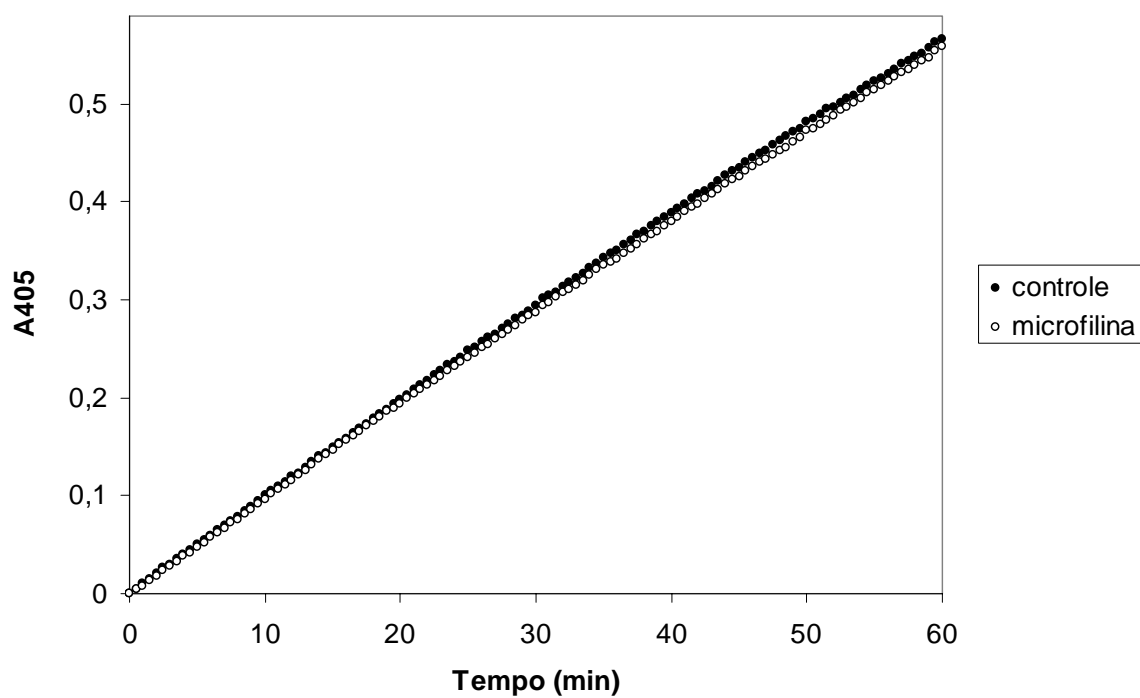


Figura 18: Efeito da microfilina sobre a atividade amidolítica da quimiotripsina. Quimiotripsina (0,5 nM) foi pré-incubada com microfilina (50 nM) por 30 min a 37°C em Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, BSA 0,1%. O substrato cromogênico suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (200 μ M) foi adicionado e a reação foi acompanhada pelo aumento na absorbância em 405 nm.

5 DISCUSSÃO

A saliva de animais hematófagos contém um arsenal de substâncias para contornar as defesas do hospedeiro e permitir o parasitismo. É também a interface com o hospedeiro, já que a saliva é injetada no local da lesão vascular e está sujeita ao reconhecimento pelo sistema imune do bovino. Entretanto, o hospedeiro não monta uma resposta imune aos componentes da saliva devido à presença de substâncias imunomodulatórias (RIBEIRO, 1989; GILLESPIE *et al.*, 2000). A hipótese de que a imunização prévia com moléculas de origem salivar pode induzir a produção de anticorpos com capacidade de inibir funções salivares, como por exemplo a anticoagulante, ainda não foi testada. Para tal é necessário identificar moléculas candidatas e dispor de quantidades suficientes das mesmas.

Devido a esse importante papel da saliva para o carrapato, nossos esforços estão voltados para a caracterização das substâncias salivares produzidas pelo *B. microplus*. Em 2000, Horn e colegas detectaram atividade anticoagulante na saliva do carrapato. Essa atividade foi purificada e caracterizada como um inibidor de trombina. O BmAP, como foi chamado, é

uma proteína de 60 kDa e inibe a atividade da trombina sobre fibrinogênio, S2238 e agregação plaquetária.

Este trabalho apresenta a purificação e a caracterização de um segundo inibidor de trombina presente na saliva de *B. microplus* chamado microfilina e identificado previamente por Kobe (2002).

A microfilina foi purificada da saliva por cromatografia de gel filtração, ultrafiltração em membrana de exclusão de 3 kDa e cromatografia de afinidade em trombina sepharose. A coluna de gel filtração utilizada separou as duas atividades anticoagulantes, sendo o primeiro pico de atividade correspondente ao BmAP. O segundo pico de atividade eluiu em frações com alta concentração de proteína e de massa molecular aparente de 35 kDa. Essas frações foram ultrafiltradas em membrana de exclusão de 3 kDa e a atividade anticoagulante foi encontrada no filtrado.

Este fato, somado à confirmação da massa molecular por espectrometria de massas, sugere que, nas condições da gel filtração, a microfilina está na forma de agregado ou associada a alguma outra proteína da saliva. Estudos de proteoma de saliva de *B. microplus* por nós realizados, mostraram que os mapas peptídicos da hidrólise por tripsina das proteínas majoritárias da saliva são similares ao da albumina bovina (dados não mostrados). Essas proteínas aparecem na eletroforese bidimensional com massa molecular de 48,7 kDa, menor que da albumina bovina (66 kDa), sugerindo que a mesma pode estar sendo processada e regurgitada pelo carrapato. A microfilina pode, então, estar associada com esses fragmentos de albumina, sugerindo um mecanismo de transporte do anticoagulante para o interior do hospedeiro.

Efetivamente, a albumina é um conhecido transportador de moléculas no sangue, como é o caso dos ácidos graxos e da bilirrubina.

Após a gel filtração, a microfilina foi purificada por cromatografia de afinidade em trombina-Sepharose. A fração retida na coluna, que contém a atividade antitrombina, foi analisada por espectrometria de massa e análise de aminoácidos. Essas análises revelaram que se trata do segundo menor inibidor de trombina peptídico natural já descrito. Os menores anticoagulantes de natureza peptídica encontrados até agora foram o peptídeo inibidor de fXa e trombina F6, de 720 Da (IBRAHIM *et al.*, 2001), os antitrombina TTI, de 3,5 kDa (CAPPELLO *et al.*, 1996), anofelina, de 6,5 kDa (FRANCISCHETTI *et al.*, 1999) e o anti-fXa TAP (WAXMAN *et al.*, 1990), de 6,8 kDa. Os anticoagulantes isolados de carrapatos, até o momento, não seguem um padrão de tamanho ou alvo fisiológico, mas, claramente, seu arsenal farmacológico busca a evasão das defesas do hospedeiro de forma eficiente para alcançar o sucesso do parasitismo. Para isso, esses parasitas e outros hematófagos utilizam sistemas redundantes com moléculas direcionadas a um mesmo alvo, como é caso da inibição de trombina por microfilina e BmAP pela saliva de *B. microplus*. A singularidade da microfilina é coerente com este contexto e deve colaborar na adaptação extremamente bem sucedida deste carrapato ao seu hospedeiro bovino.

A microfilina inibe a formação de fibrina catalisada pela trombina. Entretanto, o peptídeo não inibe a atividade amidolítica da enzima sobre o substrato sintético específico S2238. Esses resultados levantaram a hipótese de que a microfilina não estaria interagindo com o sítio catalítico da trombina,

mas com outra região importante para a atividade da enzima. Reforça essa hipótese a ligação do inibidor à trombina-Sepharose, na qual a enzima teve seu sítio catalítico bloqueado com um inibidor irreversível e mesmo assim a microfilina ligou na resina. A trombina apresenta pelo menos duas regiões ricas em cargas positivas importantes no reconhecimento de substratos. Uma delas, o exosítio I ou exosítio de reconhecimento do fibrinogênio, é importante na interação com fibrinogênio, fibrina, trombomodulina e receptor de plaquetas. Como a microfilina inibe a agregação plaquetária induzida por trombina, foi testado o efeito do inibidor sobre a hidrólise de um substrato sintético longo desenhado para interagir tanto com o sítio catalítico como com o exosítio I da trombina. A microfilina inibiu a hidrólise desse substrato, sugerindo que o modo de ação do inibidor é, de fato, o bloqueio do exosítio I. Como acontece com a glicirrizina, a ligação da microfilina no exosítio I pode provocar uma mudança conformacional na trombina e facilitar o acesso ao sítio ativo de substratos pequenos como o S2238 (FRANCISCHETTI *et al.*, 1997). Outros inibidores que apresentam esse comportamento são a calcaratina isolada de *Boophilus calcaratus* (MOTOYASHIKI *et al.*, 2003), a triabina (NOESKE-JUNGBLUT *et al.*, 1995), as madaninas (IWANAGA *et al.*, 2003), a botrojaracina (ZINGALI *et al.*, 1993) e o fragmento C-terminal da hirudina (NASKI *et al.*, 1990).

Os dados da espectrometria de massa e da composição mínima de aminoácidos da microfilina mostram a presença de 6 resíduos de aminoácidos ácidos num total de 16 aminoácidos. A carga global negativa da molécula concorda com seu modo de ação e pode ser importante na interação com o

exosítio I da trombina. A possibilidade de que a interação do inibidor com a enzima seja eletrostática é reforçada pelo fato de que a microfilina é eluída da trombina-Sepharose pelo aumento da força iônica. Porém, estudos mais detalhados, como cristalografia do complexo enzima-inibidor, são necessários para determinar a natureza da interação.

A microfilina apresenta IC_{50} numa ordem de concentração de micromolar, maior que o de outros anticoagulantes salivares descritos (tabela 1). No entanto, a microfilina não é o único inibidor de trombina presente na saliva e está atuando associada com o BmAP na tarefa de bloquear a coagulação sanguínea do bovino, na qual a saliva bruta é bastante eficiente (5 μ L inibe a coagulação de 20 μ L de plasma bovino por pelo menos 60 min).

A microfilina não inibiu a atividade amidolítica do fXa, plasmina, proteína C ativada, uroquinase, quimiotripsina ou tripsina, mostrando que não se trata de um inibidor que age inespecificamente sobre a classe das serino-proteases. No entanto, estes ensaios foram realizados com substratos sintéticos pequenos e a possibilidade de que a microfilina possa interagir com outros sítios de algumas dessas enzimas não pode ser excluída (MONTEIRO, 2005). Particularmente, a microfilina aumentou a hidrólise do substrato cromogênico específico para o fator Xa similarmente ao que ocorre com a trombina. O fator Xa também apresenta um exosítio de ligação à heparina que é bloqueado pelos inibidores NAPc2 (BUDDAI *et al.*, 2002), TAP (REZAIE, 2004) e ixolaris (MONTEIRO *et al.*, 2005). A ativação do fXa pela microfilina sugere que a molécula também possa inibir a atividade do fXa sobre seu substrato natural.

A ativação verificada no caso da uroquinase sugere que talvez esta enzima também pode ser alvo da microfilina.

A determinação da seqüência de aminoácidos da microfilina, que contém 16 aminoácidos, permitirá obter a molécula por síntese em fase sólida nas quantidades necessárias para caracterizar seu mecanismo de ação e para investigações bioquímicas e farmacológicas.

Atualmente, o tratamento de distúrbios tromboembólicos é feito com drogas antiplaquetárias, trombolíticas e anticoagulantes. Entre os anticoagulantes, os mais usados são a varfarina, antagonista de vitamina K de uso oral, e a heparina e heparinas de baixa massa molecular como inibidores de trombina. Essas drogas apresentam desvantagens como o risco de hemorragia, a interação com outros fármacos no caso da varfarina e a administração por infusão intravenosa ou por injeção subcutânea várias vezes ao dia no caso dos inibidores de trombina. Assim, a busca de novos agentes anticoagulantes mais seguros e que possam ser administrados por via oral continua sendo uma necessidade (VACCA, 2000). O papel central da trombina na cascata da coagulação faz dela um alvo interessante para o desenvolvimento de novas drogas. Neste sentido, os estudos mais avançados são os realizados com análogos sintéticos da hirudina, os hirulogs como a bivalirudina, e inibidores peptidomiméticos como o argatroban (KIKELJ, 2004). A microfilina talvez possa ter utilidade terapêutica, diretamente ou como modelo para o desenho de novos inibidores, devido à sua especificidade, somada com sua estabilidade térmica e resistência à ação de enzimas

proteolíticas (não perde a atividade quando tratada com proteinase K ou tripsina) (KOBÉ, 2002).

Como componente salivar importante para a alimentação do carrapato bovino, o uso da microfilina como antígeno numa vacina contra o parasita também pode ser interessante. A produção de anticorpos anti-microfilina e anti-BmAP pelo bovino talvez possa bloquear a inibição de trombina e permitir que o sangue coagule nas peças bucais do carrapato, interferindo no repasto de sangue.

Tal objetivo pode ser alcançado, como mostraram experimentos de vacinação contra a mosca-dos-chifres utilizando o inibidor de trombina trombostasina. Neste experimento, a imunização de coelhos e bovinos com trombostasina recombinante reduziu a quantidade de sangue consumida pelo parasita e atrasou o desenvolvimento dos ovos (CUPP *et al.*, 2004). Em outra abordagem, utilizando técnicas de RNA de interferência (RNAi), foi mostrado que o silenciamento do gene do inibidor de fXa salivar Salp14 reduziu em 50-70% o peso das fêmeas ingurgitadas de *Ixodes scapularis* (NARASIMHAN *et al.*, 2004), reforçando a viabilidade da idéia de anular a ação de substâncias anticoagulantes salivares para interferir no desenvolvimento do parasita. As técnicas de RNAi também servem de ferramenta na busca de antígenos protetores em bibliotecas de cDNA (DE LA FUENTE *et al.*, 2005).

Finalmente, o *B. microplus* é o único carrapato a apresentar dois anticoagulantes salivares diferentes direcionados contra a mesma molécula da cascata da coagulação. Até o momento, têm sido relatadas duas famílias de anticoagulantes com alta homologia entre si. Os inibidores de trombina

madaninas 1 e 2 de *Haemaphysalis longicornis* apresentam 79% identidade entre si e fazem parte da principal família de proteínas secretadas (IWANAGA *et al.*, 2003). Outro carrapato, o *Ixodes scapularis*, apresenta uma família de peptídios com ação anti-fXa: Salp 14 e Salp9 tem 70% identidade entre si e 81% e 93% de identidade com a sequência N-terminal de um anticoagulante purificado da saliva (NARASIMHAN *et al.*, 2002).

Os dados apresentados neste trabalho mostram a caracterização da microfilina e, juntamente com os dados disponíveis para o BmAP (HORN *et al.*, 2000), demonstram que os dois inibidores de trombina da saliva do *B. microplus* são moléculas diferentes e tem mecanismos de ação também diferentes, o BmAP agindo no sítio ativo e a microfilina bloqueando o exosítio I da enzima.

6 CONCLUSÕES

1. A microfilina é um inibidor de trombina diferente do BmAP e deve estar atuando junto com o mesmo para impedir a coagulação do sangue do bovino durante a alimentação do carrapato;
2. A microfilina foi purificada da saliva de *B. microplus* por cromatografia de gel filtração, ultrafiltração em membrana de exclusão de 3 kDa e cromatografia de afinidade em trombina-Sepharose;
3. A microfilina é resistente à temperatura;
4. A microfilina não inibe a atividade amidolítica de fator Xa, plasmina, proteína C ativada, uroquinase, tripsina e quimiotripsina
5. A microfilina apresenta massa molecular de 1770 Da e é o segundo menor inibidor de trombina peptídico já descrito;
6. A microfilina apresenta 16 aminoácidos, dos quais 6 são aminoácidos ácidos;
7. A inibição da fibrinocoagulação e da agregação plaquetária pela microfilina é dose-dependente e tem IC₅₀ de 5 µM;
8. O mecanismo de inibição sugerido para a microfilina é o bloqueio do exossítio I da trombina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K.C.; SASAKI, S.D.; SAMPAIO, C.A.; TANAKA, A.S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **Int. Immunopharmacol.**, v.2, n.4, p.557-563, 2002.
- ANDREWS, R.K.; LÓPEZ, J.A.; BERNDT, M.C. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.29, n.1, p.91-105, 1997.
- BATLOUNI, M. Ativação plaquetária e trombose arterial. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.60, n.6, p.425-431, 1993.
- BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **J. Chromatogr.**, v.336, n.1, p.93-104, 1984.
- BITTENCOURT, V.R.E.P. Trials to control south american ticks with entomopathogenic fungi. In: HOUSE, J.A.; KOCAN, K.M.; GIBBS, E.P.J. (ed.) **Tropical veterinary diseases: control and prevention in the context of the new world order**. Annals of the New York Academy of Sciences, v.916. New York: The New York Academy of Sciences, 2000. p.555-558.
- BOMBELI, T.; MUELLER, M.; HAEBERLI, A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. **Thromb. Haemost.**, v.77, n.3, p.408-423, 1997.
- BUDDAI, S.K.; TOULOKHONOVA, L.; BERGUM, P.W.; VLASUK, G.P.; KRISHNASWAMY, S. Nematode anticoagulant protein c2 reveals a site on factor Xa that is important for macromolecular substrate binding to human prothrombinase. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.29, p.26689-26698, 2002.

- CAPPELLO, M.; VLASUK, G.P.; BERGUM, P.W.; HUANG, S.; HOTEZ, P.J. *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: a hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, n.13, p.6152-6156, 1995.
- CAPPELLO, M.; BERGUM, P.W.; VLASUK, G.P.; FURMIDGE, B.A.; PRITCHARD, D.I.; AKSOY, S. Isolation and characterization of the tsetse thrombin inhibitor: a potent antithrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans morsitans*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.54, n.5, p.475-480, 1996.
- CAPPELLO, M.; LI, S.; CHEN, X.; LI, C.B.; HARRISON, L.; NARASHIMHAN, S.; BEARD, C.B.; AKSOY, S. Tsetse thrombin inhibitor: bloodmeal-induced expression of an anticoagulant in salivary glands and gut tissue of *Glossina morsitans morsitans*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.95, n.24, p.14290-14295, 1998.
- CHARLAB, R.; VALENZUELA, J.G.; ROWTON, E.D.; RIBEIRO, J.M. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, n.26, p.15155-15160, 1999.
- CHOPIN, V.; SALZET, M.; BAERT, J.; VANDENBULCKE, F.; SAUTIERE, P.E.; KERCKAERT, J.P.; MALECHA, J. Therostasin, a novel clotting factor Xa inhibitor from the rhynchobdellid leech, *Theromyzon tessulatum*. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.42, p.32701-32707, 2000.
- CLEMETSON, K.J.; CLEMETSON, J.M. Platelet collagen receptors. **Thromb. Haemost.**, v.86, p.189-197, 2001.
- CONNOLLY, T.M.; JACOBS, J.W.; CONDRA, C. An inhibitor of collagen-stimulated platelet activation from the salivary glands of the *Haementeria officinalis* leech. I. Identification, isolation, and characterization. **J. Biol. Chem.**, v.267, n.10, p.6893-6898, 1992.
- CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle ou erradicação**. 2 ed. Rio Grande do Sul: Agropecuária, 1997. 176p.
- CUPP, M.S.; CUPP, E.W.; NAVARRE, C.; WISNEWSKI, N.; BRANDT, K.S.; SILVER, G.M.; ZHANG, D.; PANANGALA, V. Evaluation of a recombinant salivary gland protein (thrombostasin) as a vaccine candidate to disrupt blood-feeding by horn flies. **Vaccine**, v.22, p.2285-2297, 2004.
- 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. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.66, p.331-341, 1998.
- DA SILVA VAZ JR., I.; MASUDA, A.; TERMIGNONI, C. Controle imunológico do carrapato bovino. **A Hora Veterinária**, v.20, n.115, p.48-52, 2000.
- DANG, Q.D.; VINDIGNI, A.; DI CERA, E. Na allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.5977-5981, 1995.
- DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**, v.30, n.43, p.10363-10370, 1991.
- DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; GARCIA-GARCIA, J.C.; MENDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDES, M.; ENRIQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUE, O.; MACHADO, H.; LLEONART, R. Vaccination against ticks (*Boophilus spp.*): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genet. Anal.**, v.15, p.143-148, 1999.
- DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M.; GARCIA-GARCIA, J.C. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.916, p.617-621, 2000.
- DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; BLOUIN, E.F.; NARANJO, V.; KOCAN, K.M. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. **Parasitol. Res.**, v.96, n.3, p.137-141, 2005.
- DING, Z.; XU, Y. A rapid simplified purification of bovine thrombin. **Prep. Biochem.**, v.25, n.1-2, p.21-8, 1995.
- DOBROVOLSKY, A.B.; TITAEVA, E.V. The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. **Biochemistry (Moscow)**, v.67, n.1, p.99-108, 2002.
- EHEBAUER, M.T.; MANS, B.J.; GASPAR, A.R.; NEITZ, A.W. Identification of extrinsic blood coagulation pathway inhibitors from the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Exp. Parasitol.**, v.101, p.138-148, 2002.
- EIGENBROT, C.; KIRCHHOFER, D. New insight into how tissue factor allosterically regulates factor VIIa. **Trends Cardiovasc. Med.**, v.12, p.19-26, 2002.

- ESMON, C.T. Regulation of blood coagulation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1477, p.349-360, 2000.
- FERNANDEZ, A.Z.; TABLANTE, A.; BEGUIN, S.; HEMKER, H.C.; APITZ-CASTRO, R. Draculin, the anticoagulant factor in vampire bat saliva, is a *tight-binding*, noncompetitive inhibitor of activated factor X. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1434, n.1, p.135-142, 1999.
- FINNEY, S.; SEALE, L.; SAWYER, R.T.; WALLIS, R.B. Tridegin, a new peptidic inhibitor of factor XIIIa, from the blood-sucking leech *Haementeria ghilianii*. **Biochem. J.**, v.324, n.Pt 3, p.797-805, 1997.
- FRANCISCHETTI, I.M.; MONTEIRO, R.Q.; GUIMARÃES, J.A. Identification of glycyrrhizin as a thrombin inhibitor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.235, n.1, p.259-263, 1997.
- FRANCISCHETTI, I.M.; VALENZUELA, J.G.; RIBEIRO, J.M. Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v.38, n.50, p.16678-16685, 1999.
- 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.**, v.275, n.17, p.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**, v.99, n.10, p.3602-3612, 2002.
- FRAZZON, A.P.G.; DA SILVA VAZ JR., I.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vet. Parasitol.**, v.94, p.117-125, 2000.
- FRIEDRICH, T.; KROGER, B.; BIALOJAN, S.; LEMAIRE, H.G.; HOFFKEN, H.W.; REUSCHENBACH, P.; OTTE, M.; DODT, J. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. **J. Biol. Chem.**, v.268, n.22, p.16216-16222, 1993.
- FUENTES-PRIOR, P.; NOESKE-JUNGBLUT, C.; DONNER, P.; SCHLEUNING, W.; HUBER, R.; BODE, W. Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.94, p.11845-11850, 1997.

- GACHET, C. ADP receptors of platelet and their inhibition. **Thromb. Haemost.**, v.86, p.222-232, 2001.
- GARDELL, S.J.; DUONG, L.T.; DIEHL, R.E.; YORK, J.D.; HARE, T.R.; REGISTER, R.B.; JACOBS, J.W.; DIXON, R.A.F.; FRIEDMAN, P.A. Isolation, characterization, and cDNA cloning of a vampire bat salivary plasminogen-activator. **J. Biol. Chem.**, v.264, n.30, p.17947-17952, 1989.
- GASPAR, A.R.; JOUBERT, A.M.; CRAUSE, J.C.; NEITZ, A.W. Isolation and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Exp. Appl. Acarol.**, v.20, n.10, p.583-598, 1996.
- GEORGE, J.E. Present and future Technologies for tick control. In: HOUSE, J.A.; KOCAN, K.M.; GIBBS, E.P.J. (ed.) **Tropical veterinary diseases: control and prevention in the context of the new world order**. Annals of the New York Academy of Sciences, v.916. New York: The New York Academy of Sciences, 2000. p.538-588.
- GILLESPIE, R.D.; MBOW, M.L.; TITUS, R.G. The immunomodulatory factors of blood-feeding arthropod saliva. **Parasite Immunol.**, v.22, p.319-331, 2000.
- GLADWELL, T.D. Bivalirudin: a direct thrombin inhibitor. **Clin. Therap.**, v.24, n.1, p.38-58, 2002.
- GOMES, A. Controle do carrapato do boi: um problema para quem cria raças européias. Campo Grande: EMBRAPA. Gado de Corte Divulga, n.31, 1998. Disponível na Internet via <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD31.html>.
- GONZÁLES, J.C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Can. 1887): Revisão histórica e conceitual. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.23-28, 2002.
- GORDON, J.R.; ALLEN, J.R. Factors V and VII anticoagulant activities in the salivary glands of feeding *Dermacentor andersoni* ticks. **J. Parasitol.**, v.77, n.1, p.167-170, 1991.
- GRAND, R.J.A.; TURNELL, A.S.; GRABHAM, P.W. Cellular consequences of thrombin-receptor activation. **Biochem. J.**, v.313, p.353-368, 1996.
- GUEx, N.; PEITSCH, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v.18, n.15, p.2714-2723, 1997.

- HARRISON, L.M.; NERLINGER, A.; BUNGIRO, R.D.; CORDOVA, J.L.; KUZMIC, P.; CAPPELLO, M. Molecular characterization of *Ancylostoma* inhibitors of coagulation factor Xa. Hookworm anticoagulant activity in vitro predicts parasite bloodfeeding in vivo. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.8, p.6223-6229, 2002.
- HOFFMANN, A.; WALSMANN, P.; RIESENER, G.; PAINTZ, M.; MARKWARDT, F. Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*. **Die Pharmazie**, v.46, n.3, p.209-212, 1991.
- HORN, F.; DOS SANTOS, P.C.; TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.384, n.1, p.68-73, 2000.
- IBRAHIM, M.A.; GHAZY, A.H.; MAHAREM, T.M.; KHALIL, M.I. Purification and characterization of peptide anticoagulants from the embryos of the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). **J. Egypt. Ger. Soc. Zool.**, v.27, p.287-305, 1998.
- IBRAHIM, M.A.; GHAZY, A.H.; KHALIL, M.I. The embryos of the camel tick, *Hyalomma dromedarii* contain a potent peptide inhibitor of both thrombin and fXa. **J. Egypt. Ger. Soc. Zool.**, v.32, p.99-114, 2001.
- 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.**, v.270, p.1926-1934, 2003.
- JACOBS, J.W.; CUPP, E.W.; SARDANA, M.; FRIEDMAN, P.A. Isolation and characterization of a coagulation factor Xa inhibitor from black fly salivary glands. **Thromb. Haemost.**, v.64, n.2, p.235-238, 1990.
- JENNY, N.S.; MANN, K.G. Coagulation cascade: an overview. In: LOSCALZO, J.; SCHAFER, A.I. (ed.). **Thrombosis and Hemorrhage**. 2^o ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. cap 1.
- JONSSON, N.N.; MATSCHOSS, A.L.; PEPPER, P.; GREEN, P.E.; ALBRECHT, M.S.; HUNGERFORD, J.; ANSELL, J. Evaluation of TickGARDPLUS, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. **Vet. Parasitol.**, v.88, p.275-285, 2000.
- JOUBERT, A.M.; CRAUSE, J.C.; GASPAR, A.R.; CLARKE, F.C.; SPICKETT, A.M.; NEITZ, A.W. Isolation and characterization of an anticoagulant present in the salivary glands of the bont-legged tick, *Hyalomma truncatum*. **Exp. Appl. Acarol.**, v.19, n.2, p.79-92, 1995.

- KAY, B.H.; KEMP, D.H. Vaccines against arthropods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.50, n.6, p.87-96, 1994.
- KIKELJ, D. Peptidomimetic thrombin inhibitors. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.**, v.33, p.487-491, 2004.
- KOBE, S. Anticoagulantes da saliva do carrapato *Boophilus microplus*. 2002. 102 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- KROLL, M.H.; SULLIVAN, R. Mechanisms of platelet activation. In: LOSCALZO, J.; SCHAFER, A.I. (ed.). **Thrombosis and Hemorrhage**. 2^o ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. cap.12.
- LAI, R.; TAKEUCHI, H.; JONCZY, J.; REES, H.H.; TURNER, P.C. A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Gene**, v.342, p.243–249, 2004.
- LIMO, M.K.; VOIGT, W.P.; TUMBO-OERI, A.G.; NJOGU, R.M.; OLE-MOIYOI, O.K. Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Exp. Parasitol.**, v.72, n.4, p.418-429, 1991.
- LOGULLO, C.; DA SILVA VAZ JR., I.; SORGINE, M.H.; PAIVA-SILVA, G.O.; FARIA, F.S.; ZINGALI, R.B.; DE LIMA, M.F.; ABREU, L.; OLIVEIRA, E.F.; ALVES, E.W.; MASUDA, H.; GONZÁLES, J.C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P.L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v.116, p.525-532, 1998.
- MARAGANORE, J.M.; BOURDON, P.; JABLONSKI, J.; RAMACHANDRAN, K.L.; FENTON, J.W. Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. **Biochemistry**, v.29, n.30, p.7095-7101, 1990.
- MARKWARDT, F. Coagulation inhibitors from blood-sucking animals. A new line of developing antithrombotic drugs. **Die Pharmazie**, v.49, n.5, p.313-316, 1994.
- MEDVED, L.; NIEUWENHUIZEN, W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. **Thromb. Haemost.**, v.89, p.409-419, 2003.
- MONTEIRO, R.Q. Targeting exosites on blood coagulation proteases. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v.77, n.2, 275-280, 2005.

- MONTEIRO, R.Q.; REZAIE, A.R.; RIBEIRO, J.M.; FRANCISCHETTI, I.M. Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochem. J.*, v.387, p.871-877, 2005.
- MOTOYASHIKI, T.; TU, A.T.; AZIMOV, D.A.; IBRAGIM, K. Isolation of anticoagulant from the venom of tick, *Boophilus calcaratus*, from Uzbekistan. **Thromb. Res.**, v.110, n.4, p.235-241, 2003.
- NARASIMHAN, S.; KOSKI, R.A.; BEAULIEU, B.; ANDERSON, J.F.; RAMAMOORTHY, N.; KANTOR, F.; CAPPELLO, M.; FIKRIG, E. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. **Insect Mol. Biol.**, v.11, n.6, p.641-650, 2002.
- NARASIMHAN, S.; MONTGOMERY, R.R.; DEPONTE, K.; TSCHUDI, C.; MARCANTONIO, N.; ANDERSON, J.F.; SAUER, J.R.; CAPPELLO, M.; KANTOR, F.S.; FIKRIG, E. Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, n.5, p.1141-1146, 2004.
- NASKI, M.C.; FENTON II, J.W.; MARAGANORE, J.M.; OLSON, S.T.; SHAFER, J.A. The COOH-terminal domain of hirudin. An exosite-directed competitive inhibitor of the action of alpha-thrombin on fibrinogen. **J. Biol. Chem.**, v.265, n.23, p.13484-13489, 1990.
- NIENABER, J.; GASPARI, A.R.M.; NEITZ, A.W.H. Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Exp. Parasitol.**, v.93, n.2, p.82-91, 1999.
- NOESKE-JUNGBLUT, C.; KRATZSCHMAR, J.; HAENDLER, B.; ALAGON, A.; POSSANI, L.; VERHALLEN, P.; DONNER, P.; SCHLEUNING, W.D. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. **J. Biol. Chem.**, v.269, n.7, p.5050-5053, 1994.
- NOESKE-JUNGBLUT, C.; HAENDLER, B.; DONNER, P.; ALAGON, A.; POSSANI, L.; SCHLEUNING, W.D. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. **J. Biol. Chem.**, v.270, n.48, p.28629-28634, 1995.
- OFOFU, F.A. Protease activated receptors 1 and 4 govern the responses of human platelet to thrombin. **Transfus. Apheresis Sci.**, v.28, p.265-268, 2003.
- PEERSCHKE, E.I.B.; LÓPEZ, J.A. Platelet membranes and receptors. In: LOSCALZO, J.; SCHAFER, A.I. (ed.). **Thrombosis and Hemorrhage**. 2^o ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. cap.11.

- PEREIRA, P.J.B. Cristallographic and biochemical studies on serine proteinases and their inhibitors. 1999. 136 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade de Porto, Porto, 1999.
- PEREZ DE LEON, A.A.; VALENZUELA, J.G.; TABACHNICK, W.J. Anticoagulant activity in salivary glands of the insect vector *Culicoides variipennis sonorensis* by an inhibitor of factor Xa. **Exp. Parasitol.**, v.88, n.2, p.121-130, 1998.
- REDDY, V.B.; KOUNGA, K.; MARIANO, F.; LERNER, E.A. Chrysoptin is a potent glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen receptor antagonist present in salivary gland extracts of the deerfly. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.21, p.15861-15867, 2000.
- REZAI, A.R. Kinetics of factor Xa inhibition by recombinant tick anticoagulant peptide: both active site and exosite interactions are required for a slow- and tight-binding inhibition mechanism. **Biochemistry**, v.43, n.12, p.3368-3375, 2004.
- RIBEIRO, J.M. Role of saliva in tick/host interactions. **Exp Appl Acarol.**, v.1, p.15-20, 1989.
- RIBEIRO, J.M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents Dis.**, v.4, n.3, p.143-152, 1995.
- RIBEIRO, J.M.C.; SCHNEIDER, M.; GUIMARAES, J.A. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Biochem. J.**, v.308, p.243-249, 1995.
- RIBEIRO, J.M.; FRANCISCHETTI, I.M. Platelet-activating-factor-hydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **J. Exp. Biol.**, v.204, n.Pt 22, p.3887-3894, 2001.
- RIBEIRO, J.M.C.; FRANCISCHETTI, I.M.B. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu. Rev. Entomol.**, v.48, p.73-88, 2002.
- RIBEIRO, J.M.C.; ANDERSEN, M.A.C.; SILVA-NETO, V.M.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.; VALENZUELA, J.G. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.34, n.1, p.61-79, 2004a.

- RIBEIRO, J.M.C.; CHARLAB, R.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.; VALENZUELA, J.G. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.34, n.6, p.543-563, 2004b.
- RIDING, G.A.; JARMEY, J.; MCKENNA, R.V.; PEARSON, R.; COBON, G.S.; WILLADSEN, P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. **J Immunol.**, v.153, n.11, p.5158-5166, 1994.
- ROCHA, C.M.B.M. Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887). Lavras: UFLA, 1997. 20p. **Boletim Agopecuário da Universidade Federal de Lavras**, ano VII, n. 32, 1998.
- SALZET, M.; CHOPIN, V.; BAERT, J.; MATIAS, I.; MALECHA, J. Theromin, a novel leech thrombin inhibitor. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.40, p.30774-30780, 2000.
- SALZET, M. Anticoagulants and inhibitors of platelet aggregation derived from leeches. **FEBS Lett.**, v.492, n.3, p.187-192, 2001.
- SASAKI, S.D.; AZZOLINI, S.S.; HIRATA, I.Y.; ANDREOTTI, R.; TANAKA, A.S. *Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. **Biochimie**, v.86, p.643-69, 2004.
- SCHAFFER, L.W.; DAVIDSON, J.T.; VLASUK, G.P.; SIEGL, P.K.S. Antithrombotic efficacy of recombinant Tick Anticoagulant Peptide. A potent inhibitor of coagulation factor Xa in a primate model of arterial thrombosis. **Circulation**, v.84, p.1741-1748, 1991.
- SEYMOUR, J.L.; HENZEL, W.J.; NEVINS, B.; STULTS, J.T.; LAZARUS, R.A. Decorsin. A potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor from the leech *Macrobdella decora*. **J. Biol. Chem.**, v.265, n.17, p.10143-10147, 1990.
- STARK, K.R.; JAMES, A.A. A Factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Exp. Parasitol.**, v.81, n.3, p.321-331, 1995.
- STUBBS, M.T.; BODE, W. The clot thickens: clues provided by thrombin structure. **Trends Biochem. Sci.**, v.20, n.1, p.23-28, 1995.
- SWADESH, J.K.; HUANG, I.Y.; BUDZYNSKI, A.Z. Purification and characterization of hementin, a fibrinolytic protease from the leech *Haementeria ghilianii*. **J. Chromatogr.**, v.502, n.2, p.359-369, 1990.

- TUSZYNSKI, G.P.; GASIC, T.B.; GASIC, G.J. Isolation and characterization of antistasin. An inhibitor of metastasis and coagulation. **J. Biol. Chem.**, v.262, n.20, p.9718-9723, 1987.
- VACCA, J.P. New advances in the discovery of thrombin and factor Xa inhibitors. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.4, p.394-400, 2000.
- VALENZUELA, J.G.; GUIMARAES, J.A.; RIBEIRO, J.M. A novel inhibitor of factor X activation from the salivary glands of the bed bug *Cimex lectularius*. Exp. **Parasitology**, v.83, n.2, p.184-190, 1996.
- VALENZUELA, J.G.; FRANCISCHETTI, I.M.; RIBEIRO, J.M. Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. **Biochemistry**, v.38, n.34, p.11209-11215, 1999.
- VALENZUELA, J.G.; FRANCISCHETTI, I.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.K.; MATHER, T.N; RIBEIRO, J.M. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. **J Exp Biol.**, v.205, p.2843-2864, 2002a.
- VALENZUELA, J.G.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.; FRANCISCHETTI, I.M.B.; RIBEIRO, J.M.C. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.32, n.9, p.1101-1122, 2002b.
- VALENZUELA, J.G.; FRANCISCHETTI, I.M.B.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.; RIBEIRO, J.M.C. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.33, n.7, p.717-732, 2003.
- VAN DE LOCHT, A.; STUBBS, M.T.; BODE, W.; FRIEDRICH, T.; BOLLSCHWEILER, C.; HOFFKEN, W.; HUBER, R. The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? **EMBO J.**, v.15, n.22, p.6011-6017, 1996.
- VU, T.H.; HUNG, D.T.; WHEATON, V.I.; COUGHLIN, S.R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. **Cell**, v.64, p.1057-1068, 1991.
- WAIKHET-KOUADIO, P.; YUDA, M.; ANDO, K.; CHINZEI, Y. Purification and characterization of a thrombin inhibitor from the salivary glands of a malarial vector mosquito, *Anopheles stephensi*. **Biochim. Biophys. Acta (BBA)**, v.1381, n.2, p.227-233, 1998.
- WANG, X.; COONS, L.B.; TAYLOR, D.B.; STEVENS JR., S.E., ; 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.**, v.271, n.30, p.17785-17790, 1996.
- WAXMAN, L.; SMITH, D.E.; ARCURI, K.E.; VLASUK, G.P. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. **Science**, v.248, n.4955, p.593-596, 1990.
- WAXMAN, L.; CONNOLLY, T.M. Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. **J. Biol. Chem.**, v.268, n.8, p.5445-5449, 1993.
- WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Vet. Parasitol.**, v.71, p.209-222, 1997.
- ZHANG, D.; CUPP, M.S.; CUPP, E.W. Thrombostasin: purification, molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.32, n.3, p.321-330, 2002.
- 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.**, v.87, n.1, p.30-38, 1997.
- ZINGALI, R.B.; JANDROT-PERRUS, M.; GUILLIN, M.C.; BON, C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v.32, n.40, p.10794-10802, 1993.
- ZWAAL, R.F.A.; COMFURIUS, P.; BEVERS, E.M. Lipid-protein interactions in blood coagulation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1376, p.433-453, 1998.

ANEXO

CURRICULUM VITAE

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Alessandra Ciprandi

Nome em citações bibliográficas: CIPRANDI, A.

Sexo: feminino

Filiação: João Vanir Ciprandi e Maria Isabel Ciprandi

Nascimento: 26/09/1978, Porto Alegre - RS

Carteira de identidade: 3264062 / SEGUP / PA / 27/09/1995

CPF: 97667498091

Endereço profissional:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia.

Av. Bento Gonçalves 9500 Bloco IV Prédio 43431 - Sala 217

Agronomia

91501970 Porto Alegre, RS

Telefone: (51) 33166082 Fax: 33167309

E-mail: ciprandi@cbiot.ufrgs.br

URL da home page: <http://www.cbiot.ufrgs.br/cenbiot/peptideos/lapep.htm>

Endereço residencial:

Rua Novo Hamburgo 276 apt B

Passo da Areia

90520160 Porto Alegre, RS

Telefone: (51) 33627567

E-mail: aleciprandi@yahoo.com.br

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

1998 - 2002

Graduação em Farmácia.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre - RS.

Título: Anticoagulantes e antiplaquetários salivares de animais hematófagos.

Orientador: Carlos Termignoni.

2003 -

Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica).

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre - RS.

Título: Caracterização de um inibidor de trombina isolado de saliva de *Boophilus microplus*.

Orientador: Aoi Masuda.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPQ, Brasil.

3 FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2004 - 2004

Introdução a Análise Proteômica. (Carga horária: 44h)

Rede Proteoma Rio - Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro - RJ.

2003 - 2003

II Curso de Inverno de Bioquímica. (Carga horária: 120h)

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP-RP, Ribeirão Preto - SP.

2001 - 2001

Avanços Recentes Em Genômica e Proteômica.

Red de Investigación y Entrenamiento En Enfermedades Parasitarias Del Cono Sur, RTPD, Porto Alegre - RS.

4 ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

6/1999 - 5/2003

Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20.

5 ÁREAS DE ATUAÇÃO

- 1 Bioquímica, Enzimologia.
- 2 Bioquímica, Química de Macromoléculas.
- 3 Medicina Veterinária Preventiva, Doenças Parasitárias de Animais.

6 PRÊMIOS E TÍTULOS

2002 Destaque - XIV Salão de Iniciação Científica, UFRGS.

7 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

7.1 Artigos completos publicados em periódicos

CIPRANDI, Alessandra; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. Saliva de animais hematófagos: fontes de novos anticoagulantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p. 250-262, 2003.

7.2 Trabalhos completos em anais de eventos

TERMIGNONI, Carlos; KOBE, Simone; CIPRANDI, Alessandra; HORN, Fabiana. Anticoagulantes da saliva do carrapato bovino *Boophilus microplus*. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2002, Rio de Janeiro. 2002.

7.3 Resumos simples em anais de eventos

1 CIPRANDI, Alessandra; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. Microphilin, a thrombin inhibitor from *Boophilus microplus* saliva. In: XXXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2003, Caxambu. Livro de resumos. 2003. p. 32.

2 CIPRANDI, Alessandra; TERMIGNONI, Carlos; HORN, Fabiana. BmAC2, um inibidor específico de trombina presente na saliva de *Boophilus microplus*. In: XIV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Porto Alegre. Livro de Resumos. 2002. p. 337.

- 3 CIPRANDI, Alessandra; SOARES, Lílana Do Amaral; VAZ JÚNIOR, Itabajara da Silva; MASUDA, Aoi; TERMIGNONI, Carlos. *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin processing during embryogenesis. In: XXXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2002, Caxambu. Livro de Resumos. 2002. p. 42.
- 4 CIPRANDI, Alessandra; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. Modificações no padrão de proteínas de ovo de *Boophilus microplus* durante a embriogênese. In: XIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Porto Alegre. Livro de Resumos. 2002. p. 351.
- 5 CIPRANDI, Alessandra; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. Protein pattern changes in *Boophilus microplus* eggs during embryogenesis. In: XXX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2001, Caxambu. Livro de Resumos. 2001. p. 32.
- 6 BASTIANI, Michele; CIPRANDI, Alessandra; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos; GUIMARÃES, Jorge Almeida. Kininase activity from salivary gland extracts of *Boophilus microplus*. In: XXIX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2000, Caxambu. Livro de Resumos. 2000. p. 185.
- 7 CIPRANDI, Alessandra; SANTOS, Patrícia Coutinho dos; TERMIGNONI, Carlos; CHAGAS, Jair Ribeiro; HORN, Fabiana. Purificação e caracterização de um inibidor de trombina de saliva de *Boophilus microplus*. In: XII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2000, Porto Alegre. Livro de Resumos. 2000. p. 258.
- 8 CIPRANDI, Alessandra; SANTOS, Patrícia Coutinho dos; TERMIGNONI, Carlos; CHAGAS, Jair Ribeiro; HORN, Fabiana. Purification of a low-molecular-weight thrombin inhibitor from *Boophilus microplus* saliva In: XXIX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2000, Caxambu. Livro de Resumos. 2000. p. 22.
- 9 BASTIANI, Michele; CIPRANDI, Alessandra; SANTOS, Patrícia Coutinho dos; HORN, Fabiana. Isolamento de uma protease da saliva do carrapato bovino *Boophilus microplus*. In: XI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1999, Porto Alegre. Livro de Resumos. 1999. p. 243-244.

8.1 PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1 Enzitec 2004 - VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. 2004.

2 VII Encontro do Grupo Arthromint. 2003.

3 Eletroforese bidimensional. 2001.

4 Learn to fly in Proteomics - Basic and Latest in Mass Spectrometry. 2001.

5 Iniciação Científica em Relatos. 2000.