

Carlos Eduardo Silva da Cruz

**Caracterização de proteinases envolvidas
na geração de peptídeos antimicrobianos no
intestino de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sirlei Daffre

São Paulo
2009

RESUMO

CRUZ CE. Caracterização de proteinases envolvidas na geração de peptídeos antimicrobianos no intestino de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* [Tese]. São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2009.

Dados da literatura mostram que a hemoglobina é uma rica fonte de peptídeos biologicamente ativos, alguns dos quais são potentes antimicrobianos (hemocidinas). O primeiro peptídeo antimicrobiano derivado da hemoglobina bovina caracterizado em carrapatos foi o Hb33-61. Este peptídeo foi purificado a partir do homogeneizado intestinal do carrapato de boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e mostrou atividade contra bactérias gram-positivas e fungos (*Journal of Biological Chemistry*, 274 (36): 25330-34, 1999). Há evidências de que hemocidinas sejam geradas proteoliticamente no intestino do carrapato a partir da hemoglobina. No presente trabalho nós identificamos e caracterizamos bioquimicamente uma aspártico proteinase, designada BmAP, que foi isolada através de três passos cromatográficos. O seu cDNA foi clonado e seqüenciado, e a análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real mostrou que a BmAP é expressa predominantemente no intestino quando comparada aos níveis de expressão das glândulas salivares e ovários. Espectrometria de massas por *eletrospray* foi utilizada para mapear a especificidade de clivagem desta proteinase, utilizando hemoglobina bovina como substrato, mostrando que resíduos hidrofóbicos são preferencialmente clivados nos subsítios P1 e P1'. Nós também investigamos a especificidade de clivagem da BmCL1, uma catepsina L previamente imunolocalizada no intestino de *R. (B.) microplus* (*Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30 (11): 1017-26, 2000), utilizando uma biblioteca combinatória de peptídeos sintéticos e através de ensaios de hemoglobinólise *in vitro*. A BmCL1 hidrolisou a hemoglobina bovina preferencialmente em sítios contendo resíduos alifáticos na posição P2 e resíduos polares em P1 e P1'. Além disso, hidrolisou a subunidade α da hemoglobina bovina entre os resíduos A63/A64, gerando peptídeos com estruturas primárias similares ao

Hb 33-61. A hemoglobínólise com a BmAP e/ou BmCL1 resultou na formação de diversos peptídeos com massa molecular entre 982 e 3404 Da, alguns dos quais apresentaram atividade antimicrobiana, corroborando a hipótese de que tais proteinases participam na geração endógena de hemocidinas no intestino do carrapato. Nós hipotetizamos que o Hb 33-61 seja gerado pela ação de três enzimas: a BmAP, que é responsável pela hidrólise da subunidade α da hemoglobina bovina entre os aminoácidos M32/F33, a BmCL1, que hidrolisa a subunidade α entre os resíduos A63/A64, e uma exopeptidase que removeria os resíduos V62 e A63.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Peptídeos antimicrobianos. Hemocidinas. Hemoglobínólise. Aspártico-proteinase. Cisteína-proteinase. Biblioteca combinatória de tetra-peptídeos sintéticos.

ABSTRACT

CRUZ CE. Characterization of proteinases involved in the generation of antimicrobial peptides in the gut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* [PhD Thesis]. São Paulo. Graduate Program in Parasitology. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2009.

Research data has shown that hemoglobin is a rich source of biologically active peptides, some of which are potent antimicrobials (hemocidins). The first hemoglobin-derived antimicrobial peptide characterized in ticks was Hb 33-61. This peptide was purified from midgut contents of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and showed activity against both Gram-positive bacteria and fungi (*Journal of Biological Chemistry*, 274 (36): 25330-34, 1999). There is evidence that hemocidins are generated proteolytically in the tick midgut from hemoglobin. In this work we report the identification and biochemical characterization of an aspartic proteinase, designated BmAP, which was isolated from the tick midgut using three chromatographic steps. Its cDNA was cloned and sequenced, and expression analysis by qPCR revealed that BmAP is predominantly expressed in the midgut when compared with expression levels in salivary glands and ovaries. Electrospray mass spectrometry was employed to map the cleavage specificity of this proteinase using bovine hemoglobin as substrate, which showed that hydrophobic residues are preferentially cleaved at the P1 and P1' subsites. We also investigated the cleavage specificity of BmCL1, a cathepsin L immunolocalized to the intestine of *R. (B.) microplus* (*Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30 (11): 1017-26, 2000), using a combinatorial library of synthetic peptides and through *in vitro* hemoglobinolysis. BmCL1 hydrolysed bovine hemoglobin preferentially at sites containing aliphatic residues at position P2 and polar residues at P1 and P1'. This enzyme also hydrolysed the α chain of bovine hemoglobin at Ala63/Ala64, generating peptides with a primary structure similar to that of Hb 33-61. Hemoglobinolysis with BmAP and/or BmCL1 resulted in the formation of several peptides with molecular masses between 982 and 3404 Da, some of which showed antimicrobial activity, corroborating the

hypothesis that these proteinases are involved in the endogenous generation of hemocidins in the tick gut. We hypothesize that Hb 33-61 is generated by the activity of three enzymes: BmAP, which is responsible for the hydrolysis of the α chain of bovine hemoglobin at Met32/Phe33, BmCL1, which hydrolyses the α chain at Ala63/Ala64 and an exopeptidase, which would remove residues Val62 and Ala63.

Key words: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Antimicrobial peptides. Hemocidins. Hemoglobinolysis. Aspartic proteinase. Cysteine proteinase. Positional scanning synthetic combinatorial library.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, considerado o mais importante ectoparasita de bovinos em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Esta espécie de carrapato está envolvida na transmissão de doenças de grande importância veterinária, principalmente a babesiose e anaplasmose (Homer *et al.*, 2000, Jonsson *et al.*, 2008).

A anaplasmose e babesiose são conjuntamente conhecidas como Tristeza Parasitária Bovina (TPB). A TPB tem como principais agentes etiológicos os protozoários intraeritrocíticos *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a rickétsia *Anaplasma marginale*, apresentando uma maior prevalência entre animais subnutridos e com baixa resistência (Jonsson, 2006). O quadro clínico inclui febre, anemia, hemoglobinúria, icterícia, prostração e anorexia. Quando não tratada, a TPB pode evoluir para óbito em poucos dias. Além disso, esta doença tem um grande impacto econômico na bovinocultura mundial devido à dificuldade de se acompanhar a sintomatologia da doença de uma forma efetiva e principalmente devido à redução no ganho de peso e na produção de leite dos animais infectados (Jonsson *et al.*, 2001, Peter *et al.*, 2005).

As lesões formadas no couro dos animais infestados por carrapatos podem favorecer o aparecimento de infecções secundárias como miíases cutâneas e acarretam grandes prejuízos na comercialização do couro. Apenas no Brasil, estima-se que o impacto econômico causado pelos carrapatos no rebanho bovino seja superior a um bilhão de dólares anuais (Embrapa, 2000).

Devido à baixa mobilidade dos carrapatos no pasto, o seu controle baseia-se principalmente no uso de carrapaticidas diretamente sobre os bovinos (Randolph, 1998). Entretanto, as estratégias de controle químico atualmente utilizadas são dispendiosas e insustentáveis a longo prazo, pois gradativamente selecionam

linhagens resistentes de carrapatos em ambientes com alta parasitemia, além de gerar produtos de baixo valor agregado (Embrapa, 2000, Jonsson, 2006, Klafke *et al.*, 2006). Além disto, as estratégias de controle químico são prejudiciais ao meio ambiente e à saúde pública, favorecendo o acúmulo de resíduos químicos na carne e no leite (Nolan, 1985). Em termos ambientais, a necessidade de aumentar a produção de bovinos no país tem resultado na suspensão de algumas práticas tradicionais de manejo, e grandes áreas florestadas estão sendo substituídas por pastagens exóticas, tais como *Brachiaria sp* (Harris *et al.*, 2005). As desvantagens acima relatadas apontam a necessidade de se desenvolver novas estratégias de controle (Sonenshine *et al.*, 2006).

1.2 Perspectivas no manejo de carrapatos através dos controles biológico e imunológico

1.2.1 Controle biológico de carrapatos

Vários trabalhos têm demonstrado uma eficácia parcial do controle biológico de carrapatos, que envolve a utilização de bactérias e fungos patogênicos (Frazzon *et al.*, 2000, Mangold *et al.*, 1993, Zhioua *et al.*, 1997). Tal controle também envolve a utilização de pesticidas naturais, tais como os metabólitos secundários derivados da fermentação aeróbica do actinomiceto de solo *Saccharopolyspora spinosa* (Snyder *et al.*, 2009).

1.2.2 Controle imunológico de carrapatos

Rápidos avanços biotecnológicos também têm estimulado o desenvolvimento de novas vacinas no controle de carrapatos. Neste sentido, os antígenos ocultos, isto é, antígenos não expostos ao sistema imune do hospedeiro durante uma infestação natural, como por exemplo a *Bm86*, uma glicoproteína com atividade de carboxipeptidase associada ao epitélio intestinal de *R. (B.) microplus*, contribuíram

para o início do desenvolvimento de vacinas contra o carrapato de boi (Bowman e Nuttall, 2008, Nuttall *et al.*, 2006). Inicialmente observou-se que a *Bm86* induz uma resposta imunológica em bovinos vacinados, possibilitando o controle de populações de carrapatos, e esta proteína tornou-se a base de duas vacinas atualmente disponíveis no mercado. Apesar destes recentes avanços, tais vacinas não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas, o que tem estimulado a identificação de outros antígenos protetores (Jonsson *et al.*, 2000, Willadsen *et al.*, 1996). Neste sentido, uma proteína homóloga à *Bm86*, denominada *Bm95*, foi utilizada no desenvolvimento de uma vacina cubana que protege o gado contra infestações de carrapatos encontrados em diferentes áreas geográficas (Garcia-Garcia *et al.*, 2000). Um estudo mais recente indicou uma eficácia de 81,3% da *Bm95* no controle de *R. (B.) microplus* (Kumar *et al.*, 2009). Uma segunda variante da *Bm86*, denominada *SBm7462*, apresentou uma eficácia em torno de 80% na redução de alguns parâmetros biológicos de teleóginas alimentadas em bovinos imunizados (Patarroyo *et al.*, 2002). Uma outra glicoproteína não relacionada à *Bm86*, denominada *Bm91*, quando utilizado em conjunto com a *Bm86*, resultou em um aumento na eficácia de vacinação (Willadsen *et al.*, 1996).

Além de proteínas provenientes do intestino, proteínas de outros tecidos do carrapato também conferem uma imunoproteção parcial que interferem em seu sucesso reprodutivo. Como exemplo podemos citar a BYC (*Boophilus Yolk pro-Cathepsin*), uma glicoproteína de 50 kDa isolada dos ovos de *R. (B.) microplus*, onde atua sobre a degradação de vitelina (Logullo *et al.*, 1998). Os bovinos imunizados com a BYC produziram imunoglobulinas que apareceram circulantes na hemolinfa de carrapatos que parasitaram estes animais. A inoculação de teleóginas com anticorpos monoclonais anti-BYC reduziu a taxa de sobrevivência das fêmeas em até 60% com uma dose de 50 µg deste anticorpo (Vaz *et al.*, 1998). Outros trabalhos mostraram que diferentes imunoglobulinas podem ser internalizadas pelas células digestórias, transferidas para a hemolinfa e potencialmente interagir com antígenos ocultos presentes em diversos órgãos, incluindo as glândulas salivares, constituindo-se em importantes alvos vacinais (Ackerman *et al.*, 1981, Fujisaki *et al.*, 1984, Jasinskas *et*

al., 2000). Mais recentemente tem sido discutido o desenvolvimento de vacinas com dupla ação, que atuam sobre antígenos expostos mas podem apresentar reação cruzada contra antígenos ocultos, além de potencialmente afetar diferentes espécies de carrapatos. Como exemplo podemos citar a proteína secretada 64P, de 15 kDa, que foi isolada das glândulas salivares de *Rhipicephalus appendiculatus* (Nuttall *et al.*, 2006, Trimnell *et al.*, 2002).

Além das proteínas descritas acima, uma outra estratégia de controle é a utilização de inibidores de serina-proteinases como antígenos vacinais. Tais inibidores parecem desempenhar um papel importante no bloqueio da coagulação sanguínea durante a fixação de larvas ao hospedeiro (Prevot *et al.*, 2006). Neste sentido, alguns inibidores do tipo kunitz foram caracterizados em larvas de *R. (B.) microplus*, e foram capazes de inibir tripsina, elastase e calicreína plasmática (Sasaki *et al.*, 2004, Tanaka *et al.*, 1999). Além de inibidores desta família, já foram clonados e sequenciados mais de 30 cDNAs de serpinas em carrapatos de importância econômica, incluindo *Amblyomma americanum*, *Haemaphysalis longicornis*, *Ixodes scapularis* e *Rhipicephalus appendiculatus*. Algumas serpinas não são secretadas na saliva e portanto são consideradas antígenos ocultos, e apresentaram resultados promissores em ensaios de imunização (Imamura *et al.*, 2005, Imamura *et al.*, 2008, Imamura *et al.*, 2006, Mulenga *et al.*, 2007, Mulenga *et al.*, 2009).

Assim, torna-se clara a necessidade de se identificar alvos antigênicos mais eficazes, dentre eles antígenos que sejam capazes de interferir no processo digestório dos carrapatos (Choisnard *et al.*, 2002).

1.3 A digestão em carrapatos

A digestão em carrapatos é bastante distinta da observada em insetos, pois o repasto sangüíneo é gradualmente concentrado no compartimento luminal acompanhado de uma atividade hemolítica, e em um segundo estágio ocorre a digestão proteolítica em vesículas ácidas presentes nas células digestórias. Embora não haja relatos da presença de uma membrana peritrófica responsável pela

compartimentalização da digestão em *R. (B.) microplus*, esta membrana já foi descrita em algumas espécies de ixodídeos (Grigor'eva e Amosova, 2004). Além disso, acredita-se que a digestão em ixodídeos seja majoritariamente intracelular (Lara *et al.*, 2005, Lara *et al.*, 2003).

Morfologicamente, o trato digestório é constituído por uma vasta rede de divertículos ligados a um divertículo central (estômago). Pelo menos três tipos de células intestinais já foram descritas em *R. (B.) microplus*: **i.** células basofílicas, **ii.** secretórias e **iii.** digestórias (fagocíticas), além de células indiferenciadas (Agbede e Kemp, 1985).

As células basofílicas são ricas em complexo de Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, apresentam um grande número de dobras basais, o que aumenta seu contato com a hemolinfa. Acredita-se que estas células sejam responsáveis pelo controle do aporte de nutrientes e água à hemolinfa, e pela síntese de proteínas hemolinfáticas (Agbede e Kemp, 1987). Em *Rhipicephalus sanguineus*, estas células foram identificadas como sítio de síntese de vitelogenina (Coons *et al.*, 1982). No entanto, outros autores as interpretaram como células indiferenciadas, responsáveis pela reposição das células digestórias no epitélio intestinal (Walker e Fletcher, 1987).

As células secretórias apresentam aspecto colunar e são responsáveis pela liberação de moléculas presentes em grânulos de secreção para o lúmen intestinal. Estas moléculas incluem glicoproteínas com atividade hemolítica e mucopolissacarídeos, possivelmente responsáveis pela atividade anticoagulante no lúmen intestinal (Agbede e Kemp, 1985)

As células digestórias possuem um grande número de vesículas lisossomais, aonde acredita-se que ocorra a maior parte do processo digestório em meio ácido. Em *R. (B.) microplus*, recentemente foi demonstrado que estas células são capazes de captar nutrientes, especialmente hemoglobina e albumina e podem se desprender do epitélio intestinal e se tornar livres no lúmen (Lara *et al.*, 2005). Também foi demonstrado que a hemoglobina é internalizada pelas células digestórias através de endocitose mediada por receptor (Lara *et al.*, 2005).

Vários autores identificaram corpúsculos eletrondensos que aparecem no citoplasma das células digestórias ao longo da digestão. Agyei & Runham (1995) relacionaram a eletrodensidade e a cor destes grânulos à presença de ferro, denominando-os grânulos de hematina. Mais recentemente, através de estudos de microscopia usando um marcador fluorescente do tipo paládio-mesoporfirina, estes grânulos, agora denominados hemossomos, foram identificados como sendo organelas com bicamada lipídica e responsáveis pelo armazenamento e desintoxicação celular do heme (Lara *et al.*, 2003). Sendo assim, para a liberação do heme, a hemoglobina sofre um processamento proteolítico intracelular.

Em carrapatos, as hidrolases responsáveis pela digestão protéica pertencem à quatro classes de proteinases mecanisticamente diferentes: aspártico-proteinases (EC3.4.23), cisteína-proteinases (EC3.4.22), metalo-proteinases (EC3.4.24) e serina-proteinases (EC3.4.21) (Mendiola *et al.*, 1996, Miyoshi *et al.*, 2004, Renard *et al.*, 2002). Além de exercer funções digestórias essenciais para processos anabólicos como maturação e reprodução, a proteólise intestinal pode desempenhar um papel importante na resposta imune do carrapato, através da geração de peptídeos biologicamente ativos, inclusive peptídeos antimicrobianos, que podem conferir proteção contra microorganismos invasores (Fogaca *et al.*, 1999, Nakajima *et al.*, 2003, Sonenshine *et al.*, 2005). Algumas características destas proteinases serão descritas a seguir.

1.3.1 Aspártico-proteinases

Nesta classe de hidrolases estão inclusas endoproteinases tais como pepsina, quimosina e catepsinas D e E, e esta classe é constituída majoritariamente por proteinases ativas em pH ácido e inibidas por pepstatina (Barrett *et al.*, 2004). As catepsinas D são hidrolases predominantemente lisossomais que apresentam dois domínios globulares, cada um contendo uma tríade Asp-Tre-Gli envolvida na atividade catalítica. A presença de uma fissura entre estes domínios é responsável pela ligação ao substrato. A maioria destas endoproteinases hidrolisa ligações

peptídicas contendo preferencialmente resíduos aromáticos hidrofóbicos em P1 e P1' (Barrett *et al.*, 2004, Davies, 1990, Pimenta *et al.*, 2001).

Em *R. (B.) microplus*, foi constatado que a atividade hemoglobinolítica *in vitro* foi parcialmente inibida por pepstatina A utilizando homogeneizado de intestino (Mendiola *et al.*, 1996). Além de estarem presentes no intestino, aspártico proteinases também foram isoladas de ovos embrionários de *R. (B.) microplus*, dentre as quais podemos destacar a THAP (*tick heme-binding protein*), uma catepsina D que hidrolisa vitelina e é capaz de se ligar ao grupo heme, possivelmente através dos radicais propionato da protoporfirina IX (Sorgine *et al.*, 2000) e uma pró-catepsina D, denominada BYC (*Boophilus Yolk pro-Cathepsin*), cuja forma madura também está envolvida na degradação da vitelina (Abreu *et al.*, 2004). A BYC é sintetizada no corpo gorduroso, secretada para a hemolinfa, captada pelos ovócitos em desenvolvimento e ativada por proteólise durante a embriogênese. A inoculação desta enzima em bovinos gerou uma atividade imunoprotetora capaz de reduzir parcialmente a taxa de sobrevivência de teleóginas (Abreu *et al.*, 2004).

Aspártico-proteinases também já foram caracterizadas em outras espécies de carrapatos, como *Rhipicephalus appendiculatus*, *Haemaphysalis longicornis* e *Ixodes ricinus* (Boldbaatar *et al.*, 2001, Sojka *et al.*, 2008, Vundla *et al.*, 1992). Em *Haemaphysalis longicornis*, a expressão desta enzima também foi detectada nas glândulas salivares e a proteína recombinante apresentou um pH ótimo em torno de 3,5 (Boldbaatar *et al.*, 2006). Em *Ixodes ricinus*, esta proteinase parece ser expressa predominantemente no intestino (Sojka *et al.*, 2008).

Aspártico-proteinases já foram estudadas em vários outros parasitas, dentre os quais destacamos as plasmepsinas em *Plasmodium falciparum*, que são responsáveis pela hidrólise inicial da hemoglobina humana, bem como a SmCD e SjCD presentes em *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum*, respectivamente, que parecem ser essenciais para a hemoglobinolise na fase de schistosomula (Francis *et al.*, 1994, Morales *et al.*, 2008). Além da hemoglobina humana, a SmCD recombinante também hidrolisou IgG, albumina sérica e complemento C3 (Caffrey *et al.*, 2004).

1.3.2 Cisteína-proteinases

Cisteína-proteinases do clan CA estão divididas em cinco famílias: papaínas (família C1), calpaínas (família C2), streptopaínas (família C10) e ubiquitina-peptidases (famílias C12 e C19).

A família C₁ inclui as proteinases animais mais importantes (Rawlings e Barrett, 1993). A maioria dos membros desta família apresenta propriedades similares à papaína e os resíduos conservados Cis²⁵, His¹⁶⁹ e Asn¹⁷⁵, que estão diretamente envolvidos em catálise. Cisteína-proteinases pertencentes a esta família incluem as catepsinas B e L. As catepsinas B podem atuar como peptidil-dipeptidases e são bastante sensíveis a substratos contendo o dipeptídeo Arg-Arg. As catepsinas L são endopeptidases verdadeiras que preferencialmente clivam ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos em P2 e arginina ou lisina em P1, embora outros resíduos possam ser hidrolisados na posição P1 (Choe *et al.*, 2006). Outras catepsinas, tais como catepsinas K e S, também podem ser distintas pela sua especificidade no S2 (Choe *et al.*, 2006). Além de catepsinas B, outras cisteína-proteinases podem atuar como exopeptidases, tais como catepsinas C e X (Devanathan *et al.*, 2005, Molgaard *et al.*, 2007).

Em insetos, as cisteína-proteinases já caracterizadas são predominantemente lisossomais (Terra e Ferreira, 1994). As suas principais características são: **i.** apresentam maior atividade catalítica em pH ácido, **ii.** têm um pH ótimo entre 5 e 6, **iii.** possuem massa molecular entre 20 e 40 kDa, **iv.** são inibidas por cetonas, E-64, PEP e pHMB e **v.** são ativadas por cisteína ou DTT (Terra e Ferreira, 1994).

Cisteína-proteinases já foram caracterizadas em endoparasitas dos gêneros *Schistosoma*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* e *Ancylostoma* (Alves *et al.*, 2001, Caffrey *et al.*, 2004, Gazzulo, 2002, Lanfranco *et al.*, 2008, Salas *et al.*, 1995, Williamson *et al.*, 2004). Em *Trypanosoma cruzi*, vários genes que codificam uma cruzipaina na forma de pré-pró-enzima foram identificados. Em experimentos com camundongos, a N-piperazina-Phe-hPhe-vinil fenil sulfona, que é um derivado da

vinil-sulfona, interferiu nas vias secretórias da cruzipaína e foi capaz de matar *T. cruzi* *in vivo* através do acúmulo de cruzipaína (não processada) nas cisternas do complexo de Golgi. Inibidores de cruzipaína também foram capazes de curar animais infectados, o que tornam tais compostos alvos promissores para o desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas no controle da doença de Chagas (Cazzulo, 2002, Nkemngu *et al.*, 2003).

Em *R. (B.) microplus*, Renard e colaboradores expressaram de forma recombinante uma cisteína-proteinase denominada BmCL1. A sequência obtida a partir do cDNA de larvas mostrou que ela é catepsina L-símile. A proteína madura foi imunolocalizada em vesículas de secreção das células intestinais e apresentou atividade hemoglobinolítica em meio ácido. O pré-peptídeo é composto predominantemente por resíduos hidrofóbicos característicos de peptídeo sinal (Renard *et al.*, 2000, Renard *et al.*, 2002).

A partir de ovos de *R. B. microplus* foi isolada uma catepsina L denominada VTDEC (*vitellin-degrading cysteine endopeptidase*), que apresentou alta atividade hidrolítica contra vitelina (Seixas *et al.*, 2003). Quando utilizada como antígeno vacinal, esta proteína apresentou uma eficácia de cerca de 21% em bovinos desafiados com larvas (Seixas *et al.*, 2008). Posteriormente, outra cisteína-proteinase parcialmente purificada a partir de larvas de *R. (B.) microplus* também apresentou atividade hidrolítica contra vitelina e parece ter grande importância para a sobrevivência das larvas (Estrela *et al.*, 2007).

Cisteína-proteinases também foram caracterizadas nos ixodídeos *Ixodes ricinus* e *Haemaphysalis longicornis* (Mulenga *et al.*, 1999, Sojka *et al.*, 2008). Em *Ixodes ricinus*, genes codificadores para uma catepsina B e uma legumaína foram identificados e clonados. O gene da catepsina B apresentou uma sequência que codifica uma pré-proteína de 35,7 kDa, e uma atividade de catepsina B foi determinada no extrato intestinal, sendo inibida por CA-074. A expressão deste gene foi observada predominantemente no intestino. A legumaína também foi expressa predominantemente no intestino, foi imunolocalizada em vesículas digestórias das células intestinais e na membrana peritrófica e apresentou uma estrita especificidade

por resíduos de asparagina no subsítio P1 (Sojka *et al.*, 2008). Uma legumaína também foi caracterizada em *Haemaphysalis longicornis* e teve sua expressão aumentada durante o repasto sangüíneo (Abdul Alim *et al.*, 2007).

1.3.3 Metallo-proteases

Em extratos intestinais de *R. (B.) microplus* foi sugerida a presença de uma metaloproteinase capaz de hidrolisar caseína em pH neutro, e cuja atividade foi parcialmente inibida por EDTA e 1-10 fenantrolina (Álvarez *et al.*, 2000).

Metaloproteinases envolvidas na hemoglobinólise também foram descritas em *Plasmodium falciparum* (falcilisina), que são responsáveis pela degradação de globina após a digestão inicial da hemoglobina (realizada por aspártico e cisteína-proteinases), mas não é capaz de hidrolisar hemoglobina ou globina desnaturada, apenas fragmentos menores (Eggleston *et al.*, 1999). Esta protease é ativa em pH ácido mas também pode ser ativa em pH neutro e neste último caso apresenta uma especificidade ao substrato substancialmente diferente da especificidade em pH ácido (Murata e Goldberg, 2003). Em *Schistosoma mansoni*, metaloproteinases não parecem estar envolvidas na digestão da hemoglobina (Caffrey *et al.*, 2004).

1.3.4 Serina-proteinases

Ainda há poucos estudos bioquímicos de serina-proteinases em carrapatos. Em *Rhipicephalus appendiculatus*, cDNAs que codificam serina-proteinases foram clonados e seqüenciados, com seus níveis de expressão detectados predominantemente no intestino e glândulas salivares. Além disso, um destes genes (RAMSP-3) teve o seu nível de expressão aumentado durante o repasto sanguíneo (Mulenga *et al.*, 2003). Em *Haemaphysalis longicornis*, uma serina-proteinase recombinante foi capaz de degradar albumina e o substrato Bz-L-Arg-pNA em pH 5,5, e apresentou uma seqüência sinal de secreção, sugerindo que pode ser secretada para o lúmen intestinal e potencialmente exercer uma atividade hemolítica no compartimento luminal (Miyoshi *et al.*, 2004).

1.4 Redes de proteinases envolvidas na digestão da hemoglobina

Em *Schistosoma mansoni* já foram caracterizadas algumas endo- e exopeptidases envolvidas na degradação protéica no hospedeiro vertebrado, dentre elas uma asparaginil endopeptidase (legumaína) capaz de ativar catepsinas intestinais do tipo B, L e D (Delcroix *et al.*, 2006, Sajid *et al.*, 2003). Neste parasita, a catepsina D parece desempenhar uma atividade hemoglobinolítica primária, após o qual as subunidades da hemoglobina humana podem sofrer a ação de catepsinas L e B, sendo que estas duas últimas apresentaram certa redundância na degradação da hemoglobina (Delcroix *et al.*, 2006).

Interessantemente, uma cascata de proteinases similar foi caracterizada no intestino de *Ixodes ricinus*, tendo sido identificadas catepsinas B, L, C, D e uma legumaína (Sojka *et al.*, 2008, Sojka *et al.*, 2007). Além disso, a legumaína identificada neste carrapato foi capaz de ativar a forma zimogênica da catepsina B1 presente em *Schistosoma mansoni* (Sojka *et al.*, 2007). Até o momento, no intestino de *R. (B.) microplus*, esta cascata proteolítica não foi totalmente elucidada, sendo identificadas apenas catepsinas do tipo L e D (Mendiola *et al.*, 1996, Renard *et al.*, 2000, Renard *et al.*, 2002).

Além de suas atividades hidrolíticas, tais proteinases são importantes do ponto de vista imunológico, pois são capazes de gerar fragmentos com atividade antimicrobiana e que podem ter uma ação contra microorganismos invasores, além de servirem como alvo para o desenvolvimento de vacinas (Fogaça *et al.*, 1999, Parizi *et al.*, 2009, Sonenshine *et al.*, 2005).

1.5 Peptídeos biologicamente ativos provenientes da hemoglobina

Muitos trabalhos têm demonstrado que a hemoglobina constitui uma importante fonte de peptídeos com diversas funções biológicas, incluindo peptídeos com atividade antimicrobiana e muitos dos quais são endogenamente gerados (Ivanov *et al.*, 1997, Liepke *et al.*, 2003, Mak *et al.*, 2004). Também, nos últimos 10

anos, outros trabalhos têm descrito a atividade antimicrobiana de peptídeos derivados da hidrólise química ou enzimática de hemoproteínas e, recentemente, tais peptídeos passaram a ser coletivamente denominados hemocidinas (Daoud *et al.*, 2005, Froidevaux *et al.*, 2001, Recio e Visser, 1999).

1.5.1 Hemocidinas derivadas da hemoglobina em carrapatos

Em *R. (B.) microplus*, um peptídeo antimicrobiano foi purificado do conteúdo intestinal. Este peptídeo apresentou uma massa molecular de 3.205 Da e atividade contra bactérias gram-positivas e fungos, foi pouco hemolítico contra eritrócitos bovinos e praticamente inativo contra o parasita *Leishmania amazonensis* (Fogaca, 2003). A sequência de aminoácidos obtida por degradação de Edman mostrou que ele é idêntico ao fragmento 33-61 da subunidade α da hemoglobina bovina e por isso foi designado **Hb 33-61**.

Considerando-se que o lisado de eritrócitos bovinos não apresentou atividade antimicrobiana, foi sugerido que a hemoglobina do hospedeiro bovino seja processada no intestino do carrapato, produzindo moléculas de defesa contra microorganismos. Este foi o primeiro relato de um fragmento da hemoglobina com atividade antimicrobiana produzido *in vivo* (Fogaca *et al.*, 1999). Posteriormente, a partir do intestino do carrapato *Ornithodoros moubata*, foram identificados os peptídeos α 1-32 e α 3-32 oriundos da hemoglobina de coelho, com atividade anti-*Staphylococcus aureus* (Nakajima *et al.*, 2003).

A estrutura terciária do peptídeo sintético de carboxila amidada Hb 33-61a, bem como seus análogos truncados amidados Hb 33-52a, Hb 48-61a e Hb 40-61a, foi elucidada por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) na presença de micelas de SDS. Nestes modelos, foi demonstrado que a região N-terminal serve como “âncora” para estabilizar o peptídeo na membrana plasmática, enquanto que a região C-terminal é responsável pela permeabilização da membrana plasmática (Machado *et al.*, 2007, Sforca *et al.*, 2005). Além disso, os peptídeos Hb 33-61a e Hb 40-61a apresentaram uma MIC de 3,12-6,25 μ M contra *Candida albicans*, um valor que é quatro vezes menor que a MIC dos peptídeos não amidados

Hb 33-61 e Hb 40-61, sugerindo que a presença da amidação na porção C-terminal estabiliza a sua conformação e potencializa a sua atividade antimicrobiana (Machado et al, 2007). Estes mesmos autores demonstraram que o fragmento Hb 40-61 corresponde à mínima porção do peptídeo Hb 33-61 com atividade anti-*Candida* (Machado et al., 2007). Além disso, há evidências de que peptídeos com estruturas terciárias similares tenham um modo de ação similar ao do Hb 33-61 (Lindberg et al., 2001, Machado et al., 2007, Sforca et al., 2005).

1.5.2 Caracterização de outras hemocidinas

Recentemente foi descrito que a forma tetramérica da hemoglobina humana possui atividade contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, sendo esta atividade também observada nas cadeias α e β separadamente (Parish et al., 2001). Além disso, algumas hemocidinas derivadas da proteólise péptica da hemoglobina bovina já foram descritas, tais como os fragmentos α 1-23 e α 107-136, que apresentaram atividade anti-*Micrococcus luteus* A270, com uma MIC de 670 μ M e 76 μ M, respectivamente (Daoud et al., 2005, Froidevaux et al., 2001).

Um estudo mais recente mostrou a atividade antimicrobiana de outros peptídeos derivados da digestão *in vitro* da hemoglobina bovina (Nedjar-Arroume et al., 2008). Neste trabalho, sugeriu-se que hemocidinas derivadas da proteólise enzimática da hemoglobina possuem características em comum, tais como carga líquida positiva e alta porcentagem de resíduos hidrofóbicos. Além disso, a estrutura secundária predita demonstrou que alguns destes peptídeos apresentam alta porcentagem de estruturas em alfa hélice, ao passo que outros são constituídos majoritariamente de estruturas em *random coil* (Nedjar-Arroume et al., 2008).

Sendo assim, o número crescente de hemocidinas sendo descritas na literatura atesta a importância da hemoglobina como “reservatório de peptídeos” com diversas funções biológicas, dentre elas a sua atividade antimicrobiana no controle de infecções através de proteólise endógena (Deng et al., 2009, Mak et al., 2004).

CONCLUSÃO

O número crescente de fragmentos isolados a partir de heme proteínas em diferentes organismos atesta a importância destas proteínas como reservatórios de peptídeos bioativos apresentando diversas atividades fisiológicas. A presença de hemocidinas oriundas da hemoglobínólise no intestino do carrapato pode ter um papel importante na imunidade deste órgão, se considerarmos a potente atividade antimicrobiana reportada para alguns destes peptídeos (Fogaca *et al.*, 1999, Nedjar-Arroume *et al.*, 2008, Sonenshine *et al.*, 2005). Ao lado das hemocidinas, outros peptídeos antimicrobianos podem ser efetivos no controle de infecções no intestino do carrapato, como já descrito em insetos (Boulanger *et al.*, 2002). Já foram descritas defensinas que são expressas pelas células do epitélio intestinal em *Ornithodoros moubata* e que participaram no controle de patógenos, sendo ativas contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O-157 (Nakajima *et al.*, 2002, Ueda, 2007).

Em conclusão, nossos resultados sugerem que aspártico e cisteína-proteinases podem agir de forma coordenada na hemoglobínólise intracelular, considerando a sua complementaridade de especificidade. Estas atividades resultam na geração endógena de hemocidinas que podem ser importantes no controle de patógenos invasores no intestino.

Após mapearmos a especificidade das principais endoproteinases digestórias, procederemos à análise do efeito de anticorpos e RNA de interferência em diferentes parâmetros biológicos de teleóginas, que poderão ser importantes para o controle não só dos patógenos, mas também do próprio carrapato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdul Alim M, Tsuji N, Miyoshi T, Khyrul Islam M, Huang X, Motobu M, Fujisaki K. Characterization of asparaginyl endopeptidase, legumain induced by blood feeding in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem Molec.* 2007;37(9):911-22.

Abreu LA, Valle D, Manso PP, Facanha AR, Pelajo-Machado M, Masuda H, Masuda A, Vaz I, Jr., Lenzi H, Oliveira PL, Logullo C. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34(5):443-9.

Ackerman S, Clare FB, McGill TW, Sonenshine DE. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis* (Say). *J Parasitol.* 1981;67(5):737-40.

Agbede RIS, Kemp DH. *Boophilus microplus* (Ixodid tick) - fine structure of the gut basophilic cell in relation to water and ion transport. *Experimental & Applied Acarology.* 1987;3(3):233-42.

Agbede RIS, Kemp DH. Digestion in the cattle tick *Boophilus microplus* - light-microscope study of the gut cells in nymphs and females. *Int J Parasitol.* 1985;15(2):147-57.

Álvarez HMM, Mendiola-Martínez J, Fernandez-Calienes A, Valdéz M. Identificación de una proteasa neutra en intestino de *Boophilus microplus* por electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina. *Rev Cubana Med Trop.* 2000;52(3):165-9.

Alves LC, Judice WA, St Hilaire PM, Meldal M, Sanderson SJ, Mottram JC, Coombs GH, Juliano L, Juliano MA. Substrate specificity of recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;116(1):1-9.

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 2006;22(2):195-201.

Barrett AJ, Rawlings ND, Wasner JF. Handbook of proteolytic enzymes, second ed. London: Academic Press; 2004.

Belmonte R Isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos derivados da digestão da hemoglobina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Beyer BM, Dunn BM. Prime region subsite specificity characterization of human cathepsin D: the dominant role of position 128. *Protein Sci.* 1998;7(1):88-95.

Blanco-Labra A, Martinez-Gallardo NA, Sandoval-Cardoso L, Delano-Frier J. Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* larvae (Herbst). *Insect Biochem Molec.* 1996;26(1):95-100.

Boldbaatar D, Sikalizyo Sikasunge C, Battsetseg B, Xuan X, Fujisaki K. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem Molec.* 2006;36(1):25-36.

Boldbaatar D, Xuan XN, Kimbita E, Huang XH, Igarashi I, Byambaa B, Battsetseg B, Battur B, Battsetseg G, Batsukh Z, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T. Detection of antibodies to *Hypoderma lineatum* in cattle by Western blotting with recombinant hypodermin C antigen. *Vet Parasitol.* 2001;99(2):147-54.

Boulanger N, Munks RJ, Hamilton JV, Vovelle F, Brun R, Lehane MJ, Bulet P. Epithelial innate immunity. A novel antimicrobial peptide with antiparasitic activity in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49921-6.

Bowman AS, Nuttall PA. Ticks: Biology, disease and control. Cambridge: Cambridge University Press; 2008.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Brindley PJ, Kalinna BH, Wong JYM, Bogitsh BJ, King LT, Smyth DJ, Verity CK, Abbenante G, Brinkworth RI, Fairlie DP, Smythe ML, Milburn PJ, Bielefeldt-Ohmann H, Zheng Y, McManus DP. Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;112(1):103-12.

Caffrey CR, McKerrow JH, Salter JP, Sajid M. Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol.* 2004;20(5):241-8.

Cazzulo JJ. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem*. 2002;2(11):1261-71.

Choe Y, Leonetti F, Greenbaum DC, Lecaille F, Bogyo M, Bromme D, Ellman JA, Craik CS. Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *J Biol Chem*. 2006;281(18):12824-32.

Choisnard L, Froidevaux R, Nedjar-Arroume N, Lignot B, Vercaigne-Marko D, Krier F, Dhulster P, Guillochon D. Kinetic study of the appearance of an anti-bacterial peptide in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis. *Biotechnol Appl Biochem*. 2002;36:187-94.

Coons LB, Tarnowski B, Ourth DD. *Rhipicephalus sanguineus* - localization of vitellogenin synthesis by immunological methods and electron microscopy. *Exp Parasitol*. 1982;54(3):331-9.

Daoud R, Dubois V, Bors-Dodita L, Nedjar-Arroume N, Krier F, Chihib NE, Mary P, Kouach M, Briand G, Guillochon D. New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*. 2005;26(5):713-9.

Davies DR. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Chem*. 1990;19:189-215.

Delcroix M, Sajid M, Caffrey CR, Lim KC, Dvorak J, Hsieh I, Bahgat M, Dissous C, McKerrow JH. A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J Biol Chem*. 2006;281(51):39316-29.

Deng L, Pan X, Wang Y, Wang L, Zhou XE, Li M, Feng Y, Wu Q, Wang B, Huang N. Hemoglobin and its derived peptides may play a role in the antibacterial mechanism of the vagina. *Hum Reprod*. 2009;24(1):211-8.

Devanathan G, Turnbull JL, Ziomek E, Purisima EO, Menard R, Sulea T. Carboxy-monopeptidase substrate specificity of human cathepsin X. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329(2):445-52.

Eggleston KK, Duffin KL, Goldberg DE. Identification and characterization of falcilysin, a metallopeptidase involved in hemoglobin catabolism within the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 1999;274(45):32411-7.

Embrapa. Carrapato-de-boi: Prejuízos e Controle. Sitio: <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD42.html>. 2000.

Estrela A, Seixas A, Termignoni C. A cysteine endopeptidase from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae with vitellin digestion activity. *Comp Biochem Physiol B - Biochem Mol Biol*. 2007;148(4):410-6.

Fogaca AC Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos do carrapato de boi *Boophilus microplus* [Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.

Fogaça AC, da Silva PI, Jr., Miranda MT, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PE, Daffre S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem*. 1999;274(36):25330-4.

Fogaca AC, da Silva PI, Jr., Miranda MTM, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PE, Daffre S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem*. 1999;274(36):25330-4.

Francis SE, Gluzman IY, Oksman A, Knickerbocker A, Mueller R, Bryant ML, Sherman DR, Russell DG, Goldberg DE. Molecular characterization and inhibition of a *Plasmodium falciparum* aspartic hemoglobinase. *EMBO J*. 1994;13(2):306-17.

Frazzon APG, Vaz ID, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol*. 2000;94(1-2):117-25.

Froidevaux R, Krier F, Nedjar-Arroume N, Vercaigne-Marko D, Kosciarz E, Ruckebusch C, Dhulster P, Guillochon D. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Lett*. 2001;491(1-2):159-63.

Froidevaux R, Krier F, Nedjar-Arroume N, Vercaigne-Marko D, Kosciarz E, Ruckebusch C, Dhulster P, Guillochon D. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *Febs Letters*. 2001;491(1-2):159-63.

Fujisaki K, Kamio T, Kitaoka S. Passage of host serum components, including antibodies specific for *Theileria sergenti*, across the digestive tract of argasid and ixodid ticks. *Ann Trop Med Parasitol*. 1984;78(4):449-50.

Garcia-Garcia JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, Rodriguez M, Joglar M, Machado H, Gonzalez IL, Valdes M, Mendez L, de la Fuente J. Control of ticks resistant to immunization with *Bm86* in cattle vaccinated with the recombinant antigen *Bm95* isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*. 2000;18(21):2275-87.

Gluzman IY, Francis SE, Oksman A, Smith CE, Duffin KL, Goldberg DE. Order and specificity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway. *J Clin Invest*. 1994;93(4):1602-8.

Grigor'eva LA, Amosova LI. Peritrophic matrix in the midgut of tick females of the genus *Ixodes* (Acari: Ixodidae). *Parazitologiya*. 2004;38(1):3-11.

Guerrero FD, Miller RJ, Rousseau ME, Sunkara S, Quackenbush J, Lee Y, Nene V. BmiGI: A database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochem Molec*. 2005;35(6):585-95.

Harris JL, Backes BJ, Leonetti F, Mahrus S, Ellman JA, Craik CS. Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):7754-9.

Harris MB, Walfrido T, Mourao G, C.J. S, Guimaraes E, Sonodas F, Fachim E. Safeguarding the pantanal wetlands: threats and conservation initiatives. *Conservation Biology*. 2005;19(3):714-20.

Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR, 3rd, Krause PJ, Persing DH. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(3):451-69.

Imamura S, da Silva Vaz I, Jr., Konnai S, Yamada S, Nakajima C, Onuma M, Ohashi K. Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from *Haemaphysalis longicornis*. *Exp Appl Acarol*. 2009;48(4):345-58.

Imamura S, da Silva Vaz Junior I, Sugino M, Ohashi K, Onuma M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*. 2005;23(10):1301-11.

Imamura S, Konnai S, Vaz Ida S, Yamada S, Nakajima C, Ito Y, Tajima T, Yasuda J, Simuunza M, Onuma M, Ohashi K. Effects of anti-tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Jpn J Vet Res*. 2008;56(2):85-98.

Imamura S, Namangala B, Tajima T, Tembo ME, Yasuda J, Ohashi K, Onuma M. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vaccine*. 2006;24(13):2230-7.

Ivanov VT, Karelin AA, Philippova MM, Nazimov IV, Pletnev VZ. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool. *Biopolymers*. 1997;43(2):171-88.

Jarmey JM, Riding GA, Pearson RD, Mckenna RV, Willadsen P. Carboxydipeptidase from *Boophilus microplus* - a concealed antigen with similarity to angiotensin-converting enzyme. *Insect Biochem Molec*. 1995;25(9):969-74.

Jasinskas A, Jaworski DC, Barbour AG. *Amblyomma americanum*: specific uptake of immunoglobulins into tick hemolymph during feeding. *Exp Parasitol*. 2000;96(4):213-21.

Jonsson NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol*. 2006;137(1-2):1-10.

Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet Parasitol*. 2008;155(1-2):1-9.

Jonsson NN, Davis R, De Witt M. An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms. *Aust Vet J*. 2001;79(12):826-31.

Jonsson NN, Matschoss AL, Pepper P, Green PE, Albrecht MS, Hungerford J, Ansell J. Evaluation of TickGARD(PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Vet Parasitol*. 2000;88(3-4):275-85.

Klafke GM, Sabatini GA, de Albuquerque TA, Martins JR, Kemp DH, Miller RJ, Schumaker TT. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol*. 2006;142(3-4):386-90.

Kumar A, Garg R, Yadav CL, Vatsya S, Kumar RR, Sugumar P, Chandran D, Mangamoorib LN, Bedarkar SN. Immune responses against recombinant tick antigen, *Bm95*, for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in cattle. *Vet Parasitol*. 2009;165(1-2):119-24.

Lanfranco MF, Loayza-Muro R, Clark D, Nunez R, Zavaleta AI, Jimenez M, Meldal M, Coombs GH, Mottram JC, Izidoro M, Juliano MA, Juliano L, Arevalo J. Expression and substrate specificity of a recombinant cysteine proteinase B of *Leishmania braziliensis*. Mol Biochem Parasitol. 2008;161(2):91-100.

Lara FA, Lins U, Bechara GH, Oliveira PL. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. J Exp Biol. 2005;208(16):3093-101.

Lara FA, Lins U, Paiva-Silva G, Almeida IC, Braga CM, Miguens FC, Oliveira PL, Dansa-Petretski M. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. J Exp Biol. 2003;206(10):1707-15.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007;23(21):2947-8.

Lecaille F, Bromme D, Lalmanach G. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. Biochimie. 2008;90(2):208-26.

Lecaille F, Choe Y, Brandt W, Li Z, Craik CS, Bromme D. Selective inhibition of the collagenolytic activity of human cathepsin K by altering its S2 subsite specificity. Biochemistry. 2002;41(26):8447-54.

Lemos FJA, Terra WR. Properties and intracellular distribution of a cathepsin D-like proteinase active at the acid region of *Musca domestica* midgut. Insect Biochem. 1991;21(5):457-65.

Liepke C, Baxmann S, Heine C, Breithaupt N, Standker L, Forssmann WG. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2003;791(1-2):345-56.

Lindberg M, Jarvet J, Langel U, Graslund A. Secondary structure and position of the cell-penetrating peptide transportan in SDS micelles as determined by NMR. Biochemistry. 2001;40(10):3141-9.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real Time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Logullo C, Vaz ID, Sorgine MHF, Paiva-Silva GO, Faria FS, Zingali RB, De Lima MFR, Abreu L, Oliveira E, Alves EW, Masuda H, Gonzales JC, Masuda A, Oliveira PL. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*. 1998;116:525-32.

Machado A, Sforca ML, Miranda A, Daffre S, Pertinhez TA, Spisni A, Miranda MTM. Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine alpha-hemoglobin: effects on the structure and anticandidal activity. *Biopolymers*. 2007;88(3):413-26.

Mak P, Wojcik K, Wicherek L, Suder P, Dubin A. Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides*. 2004;25(11):1839-47.

Mangold AJ, Aguirre DH, Cafrune MM, Deechaide ST, Guglielmone AA. Evaluation of the infectivity of a vaccinal and a pathogenic *Babesia bovis* strain from Argentina to *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol*. 1993;51(1-2):143-8.

Mendiola J, Alonso M, Marquetti MC, Finlay C. *Boophilus microplus*: Multiple proteolytic activities in the midgut. *Exp Parasitol*. 1996;82(1):27-33.

Miyoshi T, Tsuji N, Islam MK, Kamio T, Fujisaki K. Cloning and molecular characterization of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem Molec*. 2004;34(8):799-808.

Miyoshi T, Tsuji N, Islam MK, Kamio T, Fujisaki K. Enzymatic characterization of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2004;66(10):1195-8.

Molgaard A, Arnau J, Lauritzen C, Larsen S, Petersen G, Pedersen J. The crystal structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) in complex with the inhibitor Gly-Phe-CHN2. *Biochem J*. 2007;401(3):645-50.

Morales ME, Rinaldi G, Gobert GN, Kines KJ, Tort JF, Brindley PJ. RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade. *Mol Biochem Parasitol*. 2008;157(2):160-8.

Motobu M, Tsuji N, Miyoshi T, Huang X, Islam MK, Alim MA, Fujisaki K. Molecular characterization of a blood-induced serine carboxypeptidase from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. FEBS J. 2007;274(13):3299-312.

Mulenga A, Khumthong R, Blandon MA. Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. J Exp Biol. 2007;210(Pt 18):3188-98.

Mulenga A, Khumthong R, Chalaire KC. *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. BMC Genomics. 2009;10:217.

Mulenga A, Misao O, Sugimoto C. Three serine proteinases from midguts of the hard tick *Rhipicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. Exp Appl Acarol. 2003;29(1-2):151-64.

Mulenga A, Sugimoto C, Ingram G, Ohashi K, Onuma M. Molecular cloning of two *Haemaphysalis longicornis* cathepsin L-like cysteine proteinase genes. J Vet Med Sci. 1999;61(5):497-502.

Murata CE, Goldberg DE. *Plasmodium falciparum* falcilysin: an unprocessed food vacuole enzyme. Mol Biochem Parasitol. 2003;129(1):123-6.

Nakajima Y, Ishibashi J, Yukuhiro F, Asaoka A, Taylor D, Yamakawa M. Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects. 2003;1624(1-3):125-30.

Nakajima Y, Ogihara K, Taylor D, Yamakawa M. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). J Med Entomol. 2003;40(1):78-81.

Nakajima Y, Taylor D, Yamakawa M. Involvement of antibacterial peptide defensin in tick midgut defense. Experimental and Applied Acarology. 2002;28(1):135-40.

Nascimento-Silva MC, Leal AT, Daffre S, Juliano L, da Silva Vaz I, Jr., Paiva-Silva Gde O, Oliveira PL, Sorgine MH. BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2008;149(4):599-607.

Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Adje EY, Traisnel J, Krier F, Mary P, Kouach M, Briand G, Guillochon D. Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*. 2008;29(6):969-77.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*. 1997;10(1):1-6.

Nkemngu NJ, Grande R, Hansell E, McKerrow JH, Caffrey CR, Steverding D. Improved trypanocidal activities of cathepsin L inhibitors. *Int J Antimicrob Ag*. 2003;22(2):155-9.

Nolan J. Mechanisms of Resistance to Chemicals in Arthropod Parasites of Veterinary Importance. *Vet Parasitol*. 1985;18(2):155-66.

Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol*. 2006;28(4):155-63.

Padilha MH, Pimentel AC, Ribeiro AF, Terra WR. Sequence and function of lysosomal and digestive cathepsin D-like proteinases of *Musca domestica* midgut enzymes. *Insect Biochem Molec*. 2009.

Parish CA, Jiang H, Tokiwa Y, Berova N, Nakanishi K, McCabe D, Zuckerman W, Xia MM, Gabay JE. Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. *Bioorg Med Chem*. 2001;9(2):377-82.

Parizi LF, Pohl PC, Masuda A, Vaz Ida S, Jr. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2009;18(1):1-7.

Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Pimentel JC, Guzman F, Patarroyo ME, Vargas MI, Prates AA, Mendes MA. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol Immunopathol*. 2002;88(3-4):163-72.

Peter RJ, Van den Bossche P, Penzhorn BL, Sharp B. Tick, fly, and mosquito control-lessons from the past, solutions for the future. *Vet Parasitol*. 2005;132(3-4):205-15.

Pimenta DC, Oliveira A, Juliano MA, Juliano L. Substrate specificity of human cathepsin D using internally quenched fluorescent peptides derived from reactive site loop of kallistatin. *Bba-Protein Struct M*. 2001;1544(1-2):113-22.

Polanowska J, Krokoszynska I, Czapinska H, Watorek W, Dadlez M, Otlewski J. Specificity of human cathepsin G. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1386(1):189-98.

Prevot PP, Adam B, Boudjeltia KZ, Brossard M, Lins L, Cauchie P, Brasseur R, Vanhaeverbeek M, Vanhamme L, Godfroid E. Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *J Biol Chem*. 2006;281(36):26361-9.

Rand KN, Moore T, Sriskantha A, Spring K, Tellam R, Willadsen P, Cobon GS. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(24):9657-61.

Randolph SE. Ticks are not insects: consequences of contrasting vector biology for transmission potential. *Parasitol Today*. 1998;14(5):186-92.

Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary Families of Peptidases. *Biochem J*. 1993;290:205-18.

Recio I, Visser S. Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin. In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *J Chromatogr A*. 1999;831(2):191-201.

Renard G, Garcia JF, Cardoso FC, Richter MF, Sakanari JA, Ozaki LS, Termignoni C, Masuda A. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochem Molec*. 2000;30(11):1017-26.

Renard G, Lara FA, de Cardoso FC, Miguens FC, Dansa-Petretski M, Termignoni C, Masuda A. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Mol Biol*. 2002;11(4):325-8.

Sajid M, McKerrow JH, Hansell E, Mathieu MA, Lucas KD, Hsieh I, Greenbaum D, Bogyo M, Salter JP, Lim KC, Franklin C, Kim JH, Caffrey CR. Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;131(1):65-75.

Salas F, Fichmann J, Lee GK, Scott MD, Rosenthal PJ. Functional expression of falcipain, a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase, supports its role as a malarial hemoglobinase. *Infect Immun*. 1995;63(6):2120-5.

Sasaki SD, Azzolini SSA, Hirata IY, Andreotti R, Tanaka AS. *Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. *Biochimie*. 2004;86(9-10):643-9.

Sasaki SD, Tanaka AS. rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick *Boophilus microplus*, its cloning, expression and biochemical characterization. *Vet Parasitol*. 2008;155(1-2):133-41.

Scarborough PE, Dunn BM. Redesign of the Substrate-Specificity of Human Cathepsin-D - the Dominant Role of Position-287 in the S-2 Subsite. *Protein Engineering*. 1994;7(4):495-502.

Scarborough PE, Guruprasad K, Topham C, Richo GR, Conner GE, Blundell TL, Dunn BM. Exploration of Subsite Binding-Specificity of Human Cathepsin-D through Kinetics and Rule-Based Molecular Modeling. *Protein Science*. 1993;2(2):264-76.

Seixas A, Dos Santos PC, Velloso FF, Vaz ID, Masuda A, Horn F, Termignoni C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*. 2003;126:155-63.

Seixas A, Leal AT, Nascimento-Silva MC, Masuda A, Termignoni C, da Silva Vaz I, Jr. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;124(3-4):332-40.

Sforca ML, Machado A, Figueredo RC, Oyama S, Jr., Silva FD, Miranda A, Daffre S, Miranda MTM, Spisni A, Pertinhez TA. The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. *Biochemistry*. 2005;44(17):6440-51.

Sharma A, Eapen A, Subbarao SK. Purification and characterization of a hemoglobin degrading aspartic protease from the malarial parasite *Plasmodium vivax*. *J Biochem*. 2005;138(1):71-8.

Silva Jr PI, Daffre S, Bulet P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33464-70.

Snyder DE, Cruthers LR, Slone RL. Preliminary study on the acaricidal efficacy of spinosad administered orally to dogs infested with the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol.* 2009;(no prelo).

Sojka D, Franta Z, Horn M, Hajdusek O, Caffrey CR, Mares M, Kopacek P. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasit Vectors.* 2008;1(1):7.

Sojka D, Hajdusek O, Dvorak J, Sajid M, Franta Z, Schneider EL, Craik CS, Vancova M, Buresova V, Bogyo M, Sexton KB, McKerrow JH, Caffrey CR, Kopacek P. IrAE: an asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol.* 2007;37(7):713-24.

Sonenshine DE, Hynes WL, Ceraul SM, Mitchell R, Benzine T. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. *Exp Appl Acarol.* 2005;36(3):207-23.

Sonenshine DE, Kocan KM, de la Fuente J. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends Parasitol.* 2006;22(12):550-1.

Sorgine MHF, Logullo C, Zingali RB, Paiva-Silva GO, Juliano L, Oliveira PL. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem.* 2000;275(37):28659-65.

Stack CM, Caffrey CR, Donnelly SM, Sessaadri A, Lowther J, Tort JF, Collins PR, Robinson MW, Xu W, McKerrow JH, Craik CS, Geiger SR, Marion R, Brinen LS, Dalton JP. Structural and functional relationships in the virulence-associated cathepsin L proteases of the parasitic liver fluke, *Fasciola hepatica*. *J Biol Chem.* 2008;283(15):9896-908.

Subramanian S, Hardt M, Choe Y, Niles RK, Johansen EB, Legac J, Gut J, Kerr ID, Craik CS, Rosenthal PJ. Hemoglobin cleavage site-specificity of the *Plasmodium falciparum* cysteine proteases falcipain-2 and falcipain-3. *PLoS One.* 2009;4(4):e5156.

Tanaka AS, Andreotti R, Gomes A, Torquato RJ, Sampaio MU, Sampaio CA. A double headed serine proteinase inhibitor--human plasma kallikrein and elastase inhibitor from *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacology.* 1999;45(1-3):171-7.

Terra WR, Ferreira C. Insect digestive enzymes - properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol B - Biochem Mol Biol*. 1994;109(1):1-62.

Trimnell AR, Hails RS, Nuttall PA. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine*. 2002;20(29-30):3560-8.

Ueda M Characterization of two defensin-like antimicrobial peptides from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis* [Mestrado]. Hokkaido: Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine; 2007.

Vaz ID, Logullo C, Sorgine M, Velloso FF, de Lima MFR, Gonzales JC, Masuda H, Oliveira PL, Masuda A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998;66(3-4):331-41.

Vundla WRM, Brossard M, Pearson DJ, Labongo VL. Characterization of aspartic proteinases from the gut of the tick, *Rhipicephalus appendiculatus* Neuman. *Insect Biochem Molec*. 1992;22(4):405-10.

Walker AR, Fletcher JD. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naive and resistant to the ticks. *Int J Parasitol*. 1987;17(8):1393-411.

Willadsen P, Smith D, Cobon G, McKenna RV. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen *Bm86* alone or in combination with recombinant *Bm91*. *Parasite Immunol*. 1996;18(5):241-6.

Williamson AL, Lecchi P, Turk BE, Choe Y, Hotez PJ, McKerrow JH, Cantley LC, Sajid M, Craik CS, Loukas A. A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *J Biol Chem*. 2004;279(34):35950-7.

Wyatt DM, Berry C. Activity and inhibition of plasmepsin IV, a new aspartic proteinase from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett*. 2002;513(2-3):159-62.

Yount NY, Bayer AS, Xiong YQ, Yeaman MR. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Biopolymers*. 2006;84(5):435-58.

Zhioua E, Browning M, Johnson PW, Ginsberg HS, LeBrun RA. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Parasitol*. 1997;83(5):815-8.