

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PERFIL INIBITÓRIO E ANTIGENICIDADE DA CISTATINA JpIocys2a DE
Ixodes ovatus

Gabriela Alves Sabadin

Porto Alegre, Fevereiro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PERFIL INIBITÓRIO E ANTIGENICIDADE DA CISTATINA JpIocys2a DE
Ixodes ovatus

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

Gabriela Alves Sabadin

Orientador: Itabajara da Silva Vaz Júnior

Porto Alegre, Fevereiro de 2015

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

Instituição:

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

Fontes Financiadoras:

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

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

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

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brasil.

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

Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japão.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha irmã, Alexandra.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Ita, pela amizade, pela oportunidade, pela confiança, pelo incentivo, pelos ensinamentos, por ser sempre solícito às minhas dúvidas.

Aos colegas Luís, Dai, Lucía, Carol, Mari, Lucas, Marília, Adri, Fernanda, Leticia e Marina, por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável, por ajudarem a todos sempre que é necessário, pelas amizades que surgiram e ainda se mantêm, pelos momentos de descontração nas festinhas e happy hours. Especialmente ao Luís e a Carol, que contribuíram em grande parte para que eu conseguisse desenvolver este trabalho.

Aos meus pais Ítalo e Rejane, pelos conselhos, por sempre me apoiarem nas minhas decisões, por acreditarem em mim, por serem exemplos de pai e mãe.

À minha irmã Alexandra, por sempre se preocupar e cuidar de mim com o mesmo amor dos meus pais.

Ao meu namorado, Rodrigo, por estar ao meu lado em bons e maus momentos, por participar das minhas decisões, sempre pensando no melhor caminho para minha vida.

Muito obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 O carrapato.....	10
1.1.1 O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	10
1.1.2 O carrapato <i>Ixodes ovatus</i>	12
1.2 Métodos de controle.....	14
1.2.1 Controle químico.....	14
1.2.2 Controle imunológico	15
1.2.2.1 Vacinas multi-espécie.....	20
1.3 Proteases	22
1.3.1 Cisteíno proteases	24
1.3.2 Cisteíno proteases na fisiologia do carrapato.....	26
1.4 Regulação de proteases	28
1.4.1 Inibidores de cisteíno proteases	29
1.4.1.1 Inibidores de cisteíno proteases na fisiologia do carrapato	31
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Animais	34
3.2 Clonagem do gene <i>JpIocys2a</i>	34
3.3 Análises <i>in silico</i>	35
3.4 Síntese do peptídeo	35
3.5 Produção de soro anti-STQ-pep.....	35
3.6 Expressão e purificação de JpIocys2a.....	36
3.7 Ensaio enzimáticos	37
3.8 Extração dos tecidos de carrapato.....	38
3.9 SDS-PAGE e western blot.....	38
4. RESULTADOS	39
4.1 Identificação e análise da sequência nucleotídica de <i>JpIocys2a</i>	39
4.2 Antigenicidade de cistatinas <i>in silico</i> e seleção do peptídeo	40

4.3 Produção da cistatina recombinante.....	41
4.4 Perfil inibitório de rJpIocys2a.....	42
4.5 Antigenicidade cruzada entre STQ-pep e cistatinas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	42
5. DISCUSSÃO	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
7. APÊNDICES	67
8. CURRÍCULO RESUMIDO DO AUTOR.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

BCA	Ácido Bicinconínico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CRT	Calreticulina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
GST	Glutathiona S-transferase
GSTHI	Glutathiona S-transferase de <i>Haemaphysalis longicornis</i>
HEPES	Ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etanosulfónico
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IgG	Imunoglobulina G
K_i	Constante de dissociação
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NBT	<i>Nitro-blue tetrazolium</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
rGST	Glutathiona S-transferase recombinante
rJpIocys2a	JpIocys2a recombinante
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i>
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio - Eletroforese em gel de poliacrilamida.
VTDC	Cisteíno endopeptidase degradadora de vitelina

RESUMO

Cistatinas são um grupo de inibidores de cisteíno proteases que atuam na regulação da proteólise e estão presentes em uma ampla variedade de organismos. Estudos sobre essa classe de inibidores em parasitas têm contribuído para elucidar suas funções na regulação de processos fisiológicos como a digestão do sangue e a supressão da resposta imune do hospedeiro durante a alimentação. Por isso, cistatinas são um alvo interessante na pesquisa para o desenvolvimento de novos métodos de controle de parasitas. Além disso, a caracterização de proteínas compartilhadas por diferentes espécies de parasitas representa uma estratégia viável para encontrar potenciais alvos para uma vacina multi-espécie. Entretanto, as funções das cistatinas nos carrapatos permanecem obscuras, especialmente na espécie *Ixodes ovatus*. Neste trabalho, foi caracterizado o perfil inibitório de rJpIocys2a, uma cistatina de *I. ovatus*, para as catepsinas B, C e L. O perfil de inibição enzimática de rJpIocys2a se mostrou variável entre catepsinas envolvidas na digestão do sangue pelo carrapato e na evasão da resposta imune do hospedeiro. Além disso, um peptídeo baseado na sequência de aminoácidos do inibidor JpIocys2a (STQ-pep) foi sintetizado e utilizado para imunização de coelhos. O soro anti-STQ-pep foi usado para analisar a antigenicidade cruzada entre cistatinas dos carrapatos *Rhipicephalus microplus* e *I. ovatus*. A análise da antigenicidade cruzada revelou que anticorpos gerados contra o peptídeo são capazes de reconhecer cistatinas nativas e recombinante de *R. microplus*. A habilidade de rJpIocys2a de inibir catepsinas relacionadas a diferentes funções sugere múltiplas funções para esse inibidor. Os resultados obtidos neste trabalho forneceram bases para outros experimentos que utilizem esta proteína como antígeno vacinal.

ABSTRACT

Cystatins are a group of cysteine protease inhibitors that act on the regulation of physiological proteolysis and are present in a wide range of organisms. Researches on this class of inhibitors in parasites have contributed to clarify their roles in the regulation of important physiological processes, such as blood digestion and suppression of the host immune response during blood feeding. Thus, cystatins are a topic of research for the development of new parasite control methods. Additionally, the characterization of proteins shared by different parasite species represents a valuable strategy to identify potential targets for a multi-species vaccine. However, cystatin functions in ticks remain undetermined, especially in *Ixodes ovatus*. This work characterized the inhibitory profile of rJpIocys2a, an *I. ovatus* cystatin, to cathepsins B, C, and L. The enzymatic inhibition profile of JpIocys2a shows a distinct modulation of cathepsins related to tick blood digestion and evasion of host immune response. In addition, a peptide from JpIocys2a amino acid sequence (STQ-pep) was synthesized and used for rabbit immunization. Anti-STQ-pep serum was used to analyze the cross-antigenicity between *Rhipicephalus microplus* and *I. ovatus* cystatins. Cross-antigenicity assays revealed that antibodies against the JpIocys2a peptide are able to recognize native and recombinant *R. microplus* ticks cystatins. The ability of rJpIocys2a to inhibit cathepsins related to different functions suggests multiple roles for JpIocys2a. The results obtained in this work provided basis for further experiments using this protein as a vaccine antigen.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O carrapato

1.1.1 O carrapato *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um ácaro que pertence à classe Arachnida, ordem Acarina e família Ixodidae. Os carrapatos desta família também são denominados “carrapatos duros” pois possuem uma estrutura quitinosa presente em grande parte da face dorsal do macho adulto e em uma pequena parte na fêmea (SONENSHINE, 2013). Até 2003, esta espécie pertencia ao gênero *Boophilus*, a partir deste ano, análises moleculares e morfológicas permitiram a reclassificação da espécie para o gênero *Rhipicephalus* (MURRELL & BARKER, 2003). O *R. microplus* é originário da Índia e foi amplamente disseminado entre as regiões tropical e subtropical do globo, onde as condições climáticas favorecem o desenvolvimento da espécie (ESTRADA-PENA et al, 2006). Diferenças morfológicas e genéticas entre cepas de *R. microplus* tem sido descritas na literatura e, apesar de opiniões divergentes entre os autores, é sugerido que os carrapatos reconhecidos como *R. microplus* do sul da África e da Austrália sejam espécies diferentes (LABRUNA et al, 2009).

Os carrapatos possuem um estilo de vida hematófago, por isto, parasitam vertebrados durante a fase de alimentação. O *R. microplus* é um carrapato monoxeno, pois necessita de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo biológico (SONENSHINE, 2013). Muitos carrapatos alimentam-se em um grupo específico de vertebrados, para *R. microplus* o bovino é o hospedeiro preferencial, no entanto, pode, eventualmente, completar seu ciclo no cavalo e em outros ruminantes como a ovelha e o veado e o búfalo (POPARA et al, 2013; GARCIA et al, 2014).

O ciclo de vida do *R. microplus* é dividido em duas fases: fase de vida livre e parasitária. Na fase de vida livre a fêmea ingurgitada, denominada teleógina, procura um

local apropriado no ambiente para realizar a postura dos ovos. Esta fase dura aproximadamente três dias e outros 15 dias em média são necessários para a postura de cerca de 3000 ovos. Os ovos depositados pela fêmea dão origem a neolarvas, que após aproximadamente 7 dias transformam-se em larvas infestantes. As condições climáticas ambientais podem interferir na velocidade da postura e eclosão dos ovos, que são afetados diretamente pela temperatura e umidade do local. Em condições ótimas, a fase de vida livre (queda, postura e eclosão) dura cerca de um mês. Estima-se que 95% da população de carrapatos de uma região encontram-se no ambiente, enquanto apenas 5% estão, de fato, parasitando o hospedeiro (CHAGAS et al, 2001). O encontro da larva infestante com o hospedeiro dá início à fase de vida parasitária, em que o carrapato busca locais preferenciais para se fixar e iniciar sua alimentação. Inicialmente a larva alimenta-se de linfa, transformando-se em metalarva, quando sofre metamorfose para ninfa. Após cerca de 7 dias as ninfas, até então assexuadas, dão origem a metaninfas fêmeas ou machos novos denominados neógina e neandro, respectivamente. Os machos adultos, chamados geandros, copulam com as fêmeas adultas, que iniciam a hematofagia até que fiquem totalmente ingurgitadas e passem do hospedeiro para o ambiente, completando o ciclo. A fêmea parcialmente ingurgitada chama-se partenógina e a totalmente ingurgitada, teleógina (GONZALES, 2003).

Devido ao hábito hematófago, os carrapatos são importantes transmissores de patógenos entre seus hospedeiros. O *R. microplus* é o responsável pela transmissão dos protozoários *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e da bactéria *Anaplasma marginale* entre os bovinos. Estes organismos são os causadores de babesiose e anaplasiose, doenças que comprometem a saúde do animal e leva, muitas vezes, à morte, gerando grande impacto econômico na pecuária (GONZALES, 2003). Além disso, o carrapato afeta a produção

pecuária diretamente, causando anemia aos bovinos, o que reflete na diminuição do rendimento na produção de carne e leite (SUTHERST et al, 1983). A reação inflamatória causada pela picada do carrapato danifica e desvaloriza o couro do animal (SEIFERT et al, 1968). Os prejuízos indiretos causados pelo carrapato estão relacionados à mão-de-obra, instalações e compra de produtos para controlar as infestações (GRISI et al, 2014). A perda econômica anual causada pelo *R. microplus* no Brasil foi estimada por Grisi et al em 3,24 bilhões de dólares (GRISI et al, 2014).

O método mais utilizado para controle de infestações em rebanhos consiste na aplicação de acaricidas químicos. No entanto, a constante aplicação destes produtos provoca a seleção de carrapatos resistentes inviabilizando a utilização do mesmo princípio ativo a longo prazo (ROSARIO-CRUZ et al, 2009). Portanto, as desvantagens da utilização de acaricidas geram a necessidade da busca por métodos alternativos. Neste contexto, o estudo de antígenos vacinais contra carrapatos vem sendo amplamente desenvolvido (MERINO et al, 2013).

1.1.2 O carrapato *Ixodes ovatus*

O carrapato *Ixodes ovatus* é um ácaro da classe Arachnida, ordem Ixodida e família Ixodidae (SONENSHINE, 2013). Os carrapatos do gênero *Ixodes* necessitam de três hospedeiros ao longo do ciclo de vida. Neste caso, a larva se alimenta no primeiro hospedeiro, voltando ao ambiente para transformar-se em ninfa. A ninfa não alimentada procura novamente o mesmo, ou outro hospedeiro para se fixar. Após a alimentação completa neste estágio, a ninfa cai no ambiente e sofre ecdise para o estágio do carrapato adulto, que vai em busca de um novo hospedeiro para completar a alimentação. A fêmea totalmente ingurgitada cai novamente, realiza oviposição no ambiente e morre. A cópula da

maioria dos *Ixodes* pode acontecer tanto no hospedeiro quanto no ambiente, ainda que o macho não tenha se alimentado (SONENSHINE, 2013).

A distribuição geográfica desta espécie está concentrada em distintos países do sudeste da Ásia, como Taiwan, Japão, Coréia e China (CHEN et al, 2010). O *Ixodes ovatus* parasita vários hospedeiros, incluindo diversas espécies de mamíferos e algumas aves, que são considerados hospedeiros raros (GUGLUELMONI et al, 2014). Humanos não são normalmente parasitados por esta espécie, no entanto, alguns casos foram relatados no Japão (FUKUOKA et al, 1989; MIYAMOTO & NAKAO, 1991).

Apesar de não haver grande contribuição do *I. ovatus* na transmissão de doenças entre seus hospedeiros, alguns trabalhos mostram que este carrapato pode ser infectado por microrganismos patogênicos. Um estudo citológico observou a presença de *Babesia microti*, agente causador da babesiose humana, na glândula salivar de *I. ovatus* naturalmente infectados (YANO et al, 2005). Outros trabalhos também relatam a infecção deste carrapato pela mesma espécie de babésia (SAITO-ITO et al, 2004; ZAMOTO-NIIKURA et al, 2012). Em 1998 foi realizado o isolamento do vírus da encefalite a partir de *I. ovatus*, indicando que esta espécie poderia estar envolvida na transmissão desta doença (TAKEDA et al, 1998). *Borrelia japônica* e *Borrelia garinii*, espécies associadas com a doença de Lyme, foram detectadas em *I. ovatus* naturalmente infectados (CHAO et al, 2014; KAWAHARA et al, 2004). Foi demonstrado que uma espécie de *Ehrlichia* isolada a partir de *I. ovatus* é patogênica para camundongos (SHIBATA et al, 2000), mas não para cães (YANO et al, 1997). Esses dados demonstram a capacidade vetorial deste carrapato, apesar de não haver descrição da relação direta do *I. ovatus* com estas doenças.

1.2 Métodos de controle

1.2.1 Controle químico

Desde o final do século XIX formulações químicas são utilizadas como acaricidas para controlar o carrapato (ABBAS et al, 2014). Atualmente este método ainda representa a principal estratégia de controle. A maioria dos acaricidas atua sobre o sistema nervoso do parasita na medida em que são absorvidos através das articulações e dos orifícios respiratórios (GONZALES, 2003). O predomínio desta prática é atribuído à relativa rapidez com que o produto diminui a população de carrapatos e ao seu custo-benefício (ABBAS et al, 2014). Apesar das vantagens observadas a curto prazo, a aplicação destes produtos gera consequências indesejadas, como a contaminação da carne e do leite. A contaminação dos produtos derivados do gado é muitas vezes associada somente ao risco da toxicidade dos acaricidas aos consumidores, entretanto, a exportação da carne também pode ser prejudicada, resultando em perdas econômicas significativas (GRISI et al, 2014). Além disso, estes produtos provocam a seleção de carrapatos resistentes, que inviabiliza a utilização da mesma classe de acaricida a longo prazo (GRAF et al, 2004). A natureza desta resistência está relacionada com a pré-existência de mutações genéticas que alteram proteínas envolvidas no mecanismo de ação do acaricida. Deste modo, carrapatos naturalmente resistentes sobrevivem e transmitem sua mutação para nova geração, originando, a cada geração, um número maior de organismos resistentes (GONZALES, 2003).

O conseqüente desenvolvimento de populações resistentes provocada pelo uso contínuo da mesma classe de acaricidas gera a necessidade da criação de novos compostos na medida em que o último se torna ineficiente. Inicialmente, o principal composto utilizado como acaricida era o arsênico, entretanto, ele possuía baixa eficiência, elevado poder

residual e toxicidade para o bovino (GEORGE et al, 2004). Posteriormente, surgiram os organoclorados, que atuam ligando-se aos receptores do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), impedindo o influxo de Cl^- nos neurônios (LAWRENCE & CASIDA, 1983). Para substituir os organoclorados, surgiram os organofosforados e carbamados, que exercem sua toxicidade através da inibição da enzima acetilcolinesterase, essencial para o funcionamento do sistema nervoso central (FAZA et al, 2013). Em seguida, os piretróides sintéticos foram introduzidos no mercado. Eles atuam como neurotoxinas nos canais de sódio, causando modificações na permeabilidade da membrana celular (NISHIMURA, 1984). As lactonas macrocíclicas compõe a última classe de acaricidas amplamente utilizados. Elas aumentam a permeabilidade da membrana aos íons cloro, hiperpolarizando a membrana neuronal e bloqueando a transmissão dos impulsos nervosos (SHOOP et al, 1995).

Outros métodos de controle para a substituição dos acaricidas vêm sendo estudados. O biocontrole utiliza a dispersão de fungos que são patógenos naturais e vivem no mesmo ambiente que o carrapato (LUBECK et al, 2008; TAVASSOLI et al, 2011). O desenvolvimento de vacinas também compõe uma grande parte dos esforços para o controle do parasita (MERINO et al, 2013). No entanto, nenhum deles possui eficiência para substituir o uso dos acaricidas.

1.2.2 Controle imunológico

Tendo em vista os efeitos indesejados da utilização de acaricidas, outros métodos de controle vêm sendo estudados. O desenvolvimento de vacinas representa uma grande parcela destes estudos (MERINO et al, 2013). Este método é baseado na vacinação do hospedeiro com uma ou mais proteínas do carrapato, de modo que o a resposta imune do

hospedeiro atue contra o parasita durante a infestação, prejudicando o seu desenvolvimento (WIKEL & BERGMAN, 1997).

A introdução do aparato bucal do carrapato na pele do hospedeiro provoca lesões teciduais e endoteliais, que induzem o processo inflamatório e recrutam células do sistema imune para o local (SCHLEGER et al, 1976). O sucesso da alimentação, no entanto, depende de um complexo sistema de proteínas e moléculas secretadas pelo carrapato através da saliva, que modulam o sistema hemostático e imunológico do hospedeiro, permitindo a fixação do carrapato e sua alimentação durante horas ou dias (FERREIRA & SILVA, 1998; BRAKE & DE LEON, 2012). Diversas moléculas da saliva do carrapato foram caracterizadas como detentoras de propriedades farmacológicas (RECK et al, 2009). Estas moléculas atuam como vasodilatadores (DICKINSON et al, 1976), anticoagulantes (HORN et al, 2000), imunossupressores (JUNCADELLA et al, 2007; KONNAI et al, 2009) e anti-inflamatórios (DERUAZ et al, 2008). Ainda que esta modulação permita a alimentação dos carrapatos durante algum período, o bovino susceptível consegue desenvolver resistência ao *R. microplus* após repetidas infestações (JONSSON et al, 2014). Estudos revelam a participação de anticorpos (ROBERTS & KERR, 1976) e linfócitos (WIKEL & ALLEN, 1976) neste processo, uma vez que foi observado aumento da resistência em hospedeiros susceptíveis através da transferência de soro e linfócitos de bovinos resistentes para bovinos susceptíveis. Outros trabalhos recentes apoiam esses dados, demonstrando a atuação da resposta imune na resistência adquirida pelos bovinos (BRANNAN et al, 2014; KASHINO et al, 2005). Na infestação de bovinos por *R. microplus*, ocorre produção de linfócitos B e T de memória, envolvidos na geração da resistência (WIKEL, 1996). Esses dados sustentam o conceito da utilização de vacinas como um método de controle efetivo contra o carrapato, uma vez que a imunidade adquirida naturalmente, ao longo de repetidas infestações, é capaz

de diminuir consideravelmente o número de carrapatos que conseguem se alimentar no bovino. Além disso, o controle de carrapatos por vacinação possui vantagens como o custo-benefício, redução da contaminação ambiental e a prevenção da seleção de carrapatos resistentes provocados pela utilização de acaricidas (DE LA FUENTE et al, 2007).

As duas vacinas contra carrapato já comercializadas são baseadas no antígeno Bm86, uma proteína intestinal de *R. microplus* (WILLADSEN et al, 1995; CANALES et al, 1997). O efeito da imunização com este antígeno é a redução do número, peso e capacidade reprodutiva das fêmeas (RODRIGUEZ et al, 1995). Como consequência da vacinação, foi possível observar a diminuição da babesiose nas regiões de vacinação e o controle da transmissão de *Anaplasma marginale* nas regiões em que o carrapato era considerado o principal vetor deste patógeno (DE LA FUENTE et al, 1998; 2007). A eficácia da vacina varia entre 51-91% entre as regiões geográficas em que a vacina foi testada. Esta diferença é atribuída à variabilidade existente na sequência de aminoácidos da Bm86 entre as diferentes populações de *R. microplus* (RODRIGUEZ et al, 1995; GARCIA-GARCIA et al, 2000). Em vista disto, a busca por antígenos mais eficazes contra o parasita continua necessária.

Muitos trabalhos buscam encontrar antígenos eficientes para serem utilizados comercialmente. Diversas técnicas são utilizadas para uma seleção preliminar de antígenos candidatos, incluindo o RNA de interferência (RNAi; DE LA FUENTE et al, 2005; 2010; ALMAZAN et al, 2010; KARIM et al, 2012) e a alimentação artificial por capilar (ALMAZAN et al, 2005; GONSIOROSKI et al, 2012). Na primeira técnica, o RNA mensageiro que codifica a proteína-alvo no carrapato é silenciado por RNAi, diminuindo os níveis de expressão da proteína. Em carrapatos, o efeito do silenciamento gênico na alimentação, oviposição e eclosão dos ovos são avaliados. A partir desta técnica é possível

identificar a função da proteína e, dependendo das consequências do silenciamento no desenvolvimento do carrapato, avaliar se o alvo é um potencial candidato como antígeno vacinal. Na alimentação artificial, os carrapatos são alimentados com auxílio de capilares contendo sangue bovino com anticorpos contra a proteína alvo, simulando a ação dos anticorpos do hospedeiro durante a hematofagia. As mesmas consequências fisiológicas do experimento com RNAi são analisadas. Esses métodos permitem a avaliação de antígenos em larga escala, uma vez que experimentos de imunização utilizando bovinos são dispendiosos e necessitam de grande infraestrutura.

Devido à eficiência do antígeno Bm86, proteínas homólogas são estudadas entre carrapatos de diferentes espécies e regiões (GARCIA-GARCIA et al, 2000; CANALES et al, 2008; 2009a; JEYABAL et al, 2010). Ba86, uma proteína de *R. annulatus*, é um ortólogo da Bm86, com 90% de similaridade. Experimentos de imunização com este antígeno recombinante comprovam sua eficiência no controle de *R. annulatus* e *R. microplus* (CANALES et al, 2009a). A proteína ortóloga de Bm86, rHaa86 de *Hyalomma anatolicum anatolicum*, foi capaz de proteger bovinos de infestações por esta espécie de carrapato e ainda reduziu a transmissão de *Theileria annulata*, um patógeno para bovinos (JEYABAL et al, 2010). Uma homóloga de Bm86 é a Bm95, uma glicoproteína que protege o bovino de infestações por *R. microplus* na América do Sul em regiões em que a Bm86 não é efetiva (CANALES et al, 2009b).

Uma fonte de potenciais antígenos alvos é a saliva do carrapato. A imunossupressão gerada durante a alimentação pode impedir o reconhecimento de diversas proteínas secretadas na saliva. Se a resposta imune do hospedeiro for previamente estimulada por uma proteína antigênica que porém não provoca este estímulo naturalmente, esta mesma proteína pode se tornar um novo alvo do sistema imune, driblando os mecanismos

imunossupressores do carrapato (DHARAMPAUL et al, 1993; ASTIGARRAGA et al, 1997; SKALLOVA, 2008). Muitas dessas proteínas estão envolvidas na transmissão de patógenos durante a alimentação (LIU et al, 2014; PETCHAMPAI et al, 2014; DAI et al, 2009; 2010; ZIVKOVIC et al, 2010; UETI et al, 2003) e algumas foram testadas como antígenos vacinais (DAI et al, 2009; 2010; SCHUIJT et al, 2011a). Salp15 é uma proteína secretada na saliva de *Ixodes scapularis* que inibe a ativação de células T CD4 (ANGUITA et al, 2002), o sistema complemento (SCHUIJT et al, 2008) e a expressão de citocinas (HOVIUS et al, 2008). Essa proteína se liga a OspC, uma proteína do patógeno *Borrelia burgdorferi*, facilitando sua sobrevivência e transmissão para o hospedeiro (RAMAMOORTHI et al, 2005). A imunização de camundongos com este antígeno foi capaz de diminuir a infecção pelo patógeno (DAI et al, 2009). Um fator de liberação de histamina de carrapato (tHRF) da espécie *I. scapularis* é superexpresso quando o carrapato está infectado por *B. burgdorferi* e parece ter um papel na transmissão deste patógeno. O silenciamento do gene que codifica esta proteína por RNAi, a imunização de coelhos com esta proteína ou a transmissão passiva de anticorpos anti-tHRF reduziu a eficiência da alimentação pelo carrapato e a infecção de camundongos pelo patógeno (DAI et al, 2010). Uma proteína inibidora da via das lectinas (TSLPI), secretada na saliva de *I. scapularis*, é capaz de proteger *B. burgdorferi* do sistema complemento do hospedeiro (SCHUIJT et al, 2011a). Apesar do silenciamento deste gene por RNAi no carrapato ter reduzido sua infecção e a do hospedeiro pelo patógeno, a imunização de camundongos com a proteína recombinante não foi capaz de bloquear a transmissão do patógeno para o hospedeiro (SCHUIJT et al, 2011b).

1.2.2.1 Vacinas multi-espécie

Dezenas de proteínas vêm sendo caracterizadas e avaliadas para o controle de diversas espécies de carrapato (MERINO et al, 2013). No entanto, foram documentadas aproximadamente 900 espécies de carrapato (GUGLIELMONE et al, 2010), e muitas delas possuem variações intra-espécie, o que dificulta a utilização destes antígenos para o controle do carrapato em locais com mais de uma espécie de carrapato. Neste sentido, uma estratégia interessante seria o desenvolvimento de uma vacina contra mais de uma, ou múltiplas espécies de carrapato. Como consequência, haveria drástica redução na transmissão de doenças entre carrapatos e hospedeiros e, também, a possível utilização da vacina em países que não possuem recursos e incentivos para o desenvolvimento de vacinas (PARIZI et al, 2012).

O conceito de uma vacina universal incide na utilização de um ou mais antígenos de carrapato em uma mesma vacina capaz de conferir imunidade protetora contra diferentes espécies de carrapatos desafiados (DE LA FUENTE et al, 2000). Para ser eficaz, a vacina precisa ser composta por proteínas altamente conservadas entre diferentes espécies de carrapatos e com variações antigênicas pequenas, capazes de induzir reação de imunidade cruzada entre as diferentes espécies (CANALES et al, 2009c; PARIZI et al, 2009). Neste sentido, o material disponível para análise é abundante: as sequências dos inúmeros genes que codificam proteínas em carrapatos são facilmente acessadas em bancos de dados; a partir dessa informação é possível encontrar genes homólogos, regiões conservadas e prever os sítios antigênicos.

Apesar da eficiência do antígeno Bm86 em algumas regiões, tem sido observado que a variação da susceptibilidade dos carrapatos a esta vacina é devido a heterogeneidade do gene *Bm86* entre populações de *R. microplus* (DE LA FUENTE et al, 1999). Por outro lado,

a mesma proteína foi utilizada para avaliar a imunogenicidade cruzada entre *R. annulatus* e *R. microplus*, desafiando bovinos vacinados com carrapatos da espécie *R. annulatus*. O experimento resultou em uma proteção de cerca de 99% (FRAGOSO et al, 1998). Outras espécies de carrapato como *R. decoloratus*, *Hyalomma a. anatolicum* e *Hyalomma dromedarii* também demonstraram índices de proteção quando desafiadas em animais imunizados com este antígeno (DE VOS et al, 2001). Além disso, uma proteína de *R. annulatus*, Ba86, utilizada em experimento de imunização também foi capaz de controlar infestação por *R. microplus*, resultando em uma proteção de 71% (CANALES et al, 2009a).

Outros antígenos também foram utilizados para avaliação de antigenicidade cruzada. Calreticulina recombinante (rCRT) de *R. microplus* e *H. longicornis* foram utilizadas em experimento de imunização e anticorpos contra as duas proteínas foram capazes de reconhecer a proteína nativa dos tecidos de *R. microplus*. Essas proteínas apresentam uma similaridade de 88,1% e possuem um perfil antigênico semelhante, o que contribui para a antigenicidade cruzada (PARIZI et al, 2009). A Glutathione S-transferase de *H. longicornis* utilizada para imunização de bovinos foi capaz de reduzir em 53% o número e 52% o peso de *R. microplus* que se alimentaram nestes bovinos (PARIZI et al, 2011). Uma outra proteína, constituinte do cemento do carrapato *R. appendiculatus*, foi capaz de proteger o hospedeiro contra infestações por *R. sanguineus* e *I. ricinus*, aparentemente reagindo com proteínas do intestino e da glândula salivar de adultos e ninfas (TRIMNELL et al, 2005).

Uma estratégia ainda mais desafiadora é a utilização de um mesmo antígeno para proteção contra diferentes classes de artrópodes. Neste sentido, duas proteínas ortólogas entre carrapatos e mosquitos foram identificadas. Elas possuem regiões de alta similaridade correspondente com alta antigenicidade, indicando sua possível utilização para proteção cruzada entre diferentes classes (PRUDENCIO et al, 2010).

1.3 Proteases

As proteases, peptidases ou enzimas proteolíticas correspondem a uma classe complexa de enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas. Essas enzimas foram descritas em vírus e organismos de todos os reinos, degradando proteínas não funcionais, regulando o proteoma da célula, ativando e inativando proteínas sinalizadoras (GABRIEL et al, 2011; LOPEZ-OTIN & BOND, 2008). Em vírus, as proteases estão envolvidas na patogenicidade e na replicação (RUDENSKAYA & PUPOV, 2008; FOUCAULT et al, 2011; WELBOURN & PAUSE, 2007). A atividade destas enzimas em bactérias foi relacionada com a virulência, patogenicidade, divisão celular, resistência a antibióticos e adaptação a condições adversas (FREES et al, 2014; RUDENSKAYA & PUPOV, 2008; DAVYDOVA & ZIGANGIROVA, 2014). Nas plantas, as proteases atuam na proteção contra parasitas e patógenos, na resistência aos fatores abióticos e no desenvolvimento de diversas estruturas vegetais (VAN DER HOORN, 2008). Em vertebrados, o sistema proteolítico participa de processos como a progressão do ciclo celular, apoptose, proliferação, migração, remodelação de tecidos, coagulação, cicatrização e resposta imune (GABRIEL et al, 2011; LOPEZ-OTIN & BOND, 2008). O crescente progresso no sequenciamento de genomas e nas análises de bioinformática permite identificar o repertório de enzimas proteolíticas que atuam em diferentes organismos; em *Drosophila melanogaster* mais de 600 genes codificam proteases (PUENTE et al, 2005), enquanto que mais de 2% dos genes humanos codificam proteases ou inibidores de proteases (SHAH et al, 2008; SOUTHAN, 2000). Essa proporção se mantém para maioria dos organismos com genoma sequenciado (RAWLINGS & MORTON, 2008). A participação dessas enzimas em processos biológicos diversificados associada a grande parcela de genes que codificam proteases refletem sua importância nos organismos.

A enzima pode iniciar a catálise em um sítio ao longo da cadeia polipeptídica (atividade endoproteásica) ou a partir de uma extremidade amino- ou carbóxi-terminal (atividade exoproteásica). Apesar de uma única ligação peptídica ser hidrolisada durante a catálise, alguns aminoácidos de cada lado do sítio de hidrólise são críticos para que a enzima consiga se ancorar e realizar a reação (RAWLINGS et al, 2014).

O banco de dados MEROPS classifica as proteases de forma hierárquica, agrupando-as em famílias e posteriormente em clãs (RAWLINGS et al, 2014). As proteases descritas até então pertencem a uma das seguintes famílias: aspártico, cisteíno, asparagino, serino, treonino, glutâmico proteases e metaloproteases (RAWLINGS & BARRETT, 1993). Nas serino, cisteíno e treonino proteases os resíduos serina, cisteína e treonina atuam, respectivamente, como nucleófilos responsáveis pela clivagem da ligação peptídica. As asparagino proteases realizam auto-hidrólise no sítio de ligação com o asparagil tendo a asparagina como nucleófilo. As proteases de ácido aspártico, ácido glutâmico e metaloproteases utilizam uma molécula de água, associada aos respectivos aminoácidos ou metais, como nucleófilo para quebra da ligação peptídica (OLDZIEJ & CIARKOWSKI, 1996; JAMES, 2004).

Apesar dessas enzimas serem essenciais em diferentes processos fisiológicos, sua superexpressão pode causar efeitos deletérios à célula. O excesso de proteases foi associado ao câncer, doenças neurodegenerativas, inflamação e doenças cardiovasculares (JOYCE et al, 2004; BAGYINSZKY et al, 2014; LEE et al, 2010; CHENG et al, 2006). Tendo em vista a complexidade de processos fisiológicos e patológicos em que as proteases atuam, a regulação da proteólise nas células e tecidos necessita de um ajuste refinado. Os inibidores de proteases compreendem uma classe de proteínas que desempenham esse papel regulatório importante, diminuindo ou anulando a atividade das proteases. Eles foram inicialmente

classificados pelo tipo de protease que inibem ou de acordo com o seu mecanismo de ação (BODE et al, 2000; LASKOWSKI et al, 1980). As serpinas, inibidores de serinoproteases, bloqueiam a atividade da enzima de maneira reversível, ligando-se ao sítio ativo da protease de modo semelhante ao seu substrato. Os inibidores de cisteíno proteases (cistatinas) se ligam em locais adjacentes ao sítio ativo da enzima impedindo o acesso do substrato. Inibidores alostéricos, como alguns inibidores de caspase, ligam-se a regiões distantes do sítio ativo que impedem a dimerização da protease e bloqueiam sua atividade (BODE & HUBER, 2000). Em 2004, Rawlings e colaboradores introduziram uma nova classificação com base na sequência de aminoácidos dos inibidores de proteases. Assim, inibidores que possuem domínios inibitórios similares e considerados homólogos são agrupados em uma mesma família, que são agrupadas em clãs. As famílias que pertencem ao mesmo clã possuem estruturas terciárias semelhantes, apesar de não possuírem, necessariamente, sequências similares. De acordo com o banco de dados MEROPS, existem atualmente 96 famílias de inibidores, agrupadas em 38 clãs (RAWLINGS et al, 2014).

1.3.1 Cisteíno proteases

Cisteíno proteases são enzimas encontradas em vários organismos, desde vírus a vertebrados (TURK et al, 2000). A característica comum desta classe de enzimas é a utilização de um resíduo de cisteína como nucleófilo e um resíduo de histidina que desprotona o nucleófilo para o ataque à ligação peptídica. Elas são divididas em 10 clãs, cada um contendo uma ou mais das 108 famílias existentes. O maior clã entre todas as cisteíno proteases é o CA, que inclui a família das papaínas e calpaínas, entre outras 33 famílias.

No clã CA, estão agrupadas todas as cisteíno proteases com estrutura ou motivos semelhantes à da papaína (RAWLINGS et al, 2014). A díade catalítica composta pelos

aminoácidos cisteína e histidina estão na ordem Cys-His. Outros dois resíduos funcionalmente importantes que estão geralmente presentes em proteases do tipo papaína são a glicina, que ajuda na formação do “*oxyanion hole*” um centro eletrofilico que estabiliza o oxigênio desprotonado, e uma asparagina (ou ácido aspártico nas famílias C12, C19, C28 e C39), que parece estar envolvido na orientação do anel imidazólico da histidina (TURK et al, 2002; ASBOTH et al, 1985). A família das papaínas recebe este nome pois a primeira cisteíno protease isolada pertencia ao fruto *Carica papaya* (mamão papaia). A partir de então, todas as proteínas que possuíam similaridade com essa enzima foram denominadas proteínas do tipo papaína (POWERS, 1995). Outra importante família de cisteíno proteases corresponde à família C13 ou do tipo legumaína. A legumaína foi identificada pela primeira vez na planta leguminosa *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) e são asparaginil endopeptidases que hidrolisam peptídeos e proteínas exclusivamente na região carbóxi dos resíduos de asparagina.

As cisteíno proteases podem estar em vesículas lisossomais ou serem secretadas, possuindo um peptídeo-sinal que direciona a proteína para o seu devido local (OTTO & SCHIRMEISTER, 1997). A maioria delas são endopeptidases (TURK et al, 2002), sendo que a catepsina C é uma carboxidipeptidase (TURK et al, 2002), a X uma carboximono ou dipeptidase (KLEMENCIC et al, 2000) e as catepsinas B e H exibem atividade endo e exopeptidásica (TURK et al, 2002). De modo similar a outras proteases, a maioria das cisteíno proteases são sintetizadas como precursores inativos e ativadas por proteólise, após a remoção da porção N-terminal. *In vitro*, a remoção do pró-peptídeo pode ser efetuada tanto pela ação de outras proteases, como a catepsina D, por autocatálise em pH ácido, ou por mudança conformacional induzida por Ca^{+2} (TURK et al, 2000; RAWLINGS et al, 2014).

Muitas cisteíno proteases são ubíquas nos organismos e algumas possuem papéis redundantes (HSING & RUDENSKY, 2005). Algumas delas, como as catepsinas S, V e K estão localizadas em tecidos específicos, sugerindo uma função mais especializada para estas enzimas (TURK et al, 2000). As catepsinas S, F e L possuem um importante papel no processamento da cadeia invariável ligada ao MHC de classe II (NAKAGAWA et al, 1998; SHI et al, 1999; 2000). A catepsina K está envolvida no processamento de pró-hormônios e pode ter relação com a geração de endostatina durante a angiogênese (TEPEL et al, 2000). A catepsina C tem um papel fundamental no processamento do pró-peptídeo de outras peptidases para ativação destas enzimas (PHAM & LEY, 1999).

1.3.2 Cisteíno proteases na fisiologia do carrapato

A atividade das cisteíno proteases tem um papel fundamental durante as etapas de digestão do sangue e embriogênese do carrapato, eventos fisiológicos cruciais durante seu ciclo de vida (SOJKA et al, 2011). O sangue ingerido sofre endocitose e a digestão em carrapatos acontece intracelularmente. Essa degradação proteolítica ocorre em pH ácido, entre 3,5 e 4,5, ambiente proporcionado pelas vesículas endossomais. No intestino, o pH varia entre 6,3 - 6,5 (SOJKA et al, 2013).

Uma série de cisteíno proteases tem sido descritas e caracterizadas em diversas espécies de carrapatos como moléculas envolvidas na digestão. Durante este processo, a degradação de proteínas do sangue ocorre de forma controlada. Por exemplo, em *Ixodes ricinus*, inicialmente a catepsina D hidrolisa a hemoglobina em grandes fragmentos; em seguida, as catepsinas L e B geram fragmentos menores, seguido pela atuação das catepsinas C e B, que geram peptídeos. A dinâmica do sistema hemoglobinolítico é aparentemente regulada ao nível da transcricional. (FRANTA et al, 2010).

Em *R. microplus* uma catepsina L (BmCl1) foi associada a digestão. Experimentos de RT-PCR e Western Blot revelaram a presença de transcritos de BmCl1 e da proteína no intestino do carrapato somente no estágio de alimentação. Através de imunolocalização, foi possível identificar a presença da proteína em vesículas secretórias do epitélio intestinal (RENARD et al, 2000). Uma asparaginil edopeptidase (legumaina) de *Haemaphysalis longicornis* (HILgm) foi caracterizada como uma molécula funcional do intestino, presente em todos os estágios do seu desenvolvimento. Foi observado também que sua expressão é regulada positivamente durante a alimentação (ALIM et al, 2007). Por outro lado, qRT-PCR mostrou que uma segunda asparaginil endopeptidase (HILgm2) do intestino do mesmo carrapato é expressa em baixos níveis durante as fases de alimentação, apesar da proteína recombinante digerir hemoglobina bovina (ALIM et al, 2008). O *knockdown* dos genes de HILgm e HILgm2 por RNAi resultou na rejeição do carrapato pelo hospedeiro e em uma significativa redução no ingurgitamento do carrapato. Além disso, foram observados redução na postura e deformidade dos ovos de carrapatos silenciados. De acordo com os autores, estas cisteíno proteases desempenham funções na proliferação e morfologia das células intestinais uma vez que danos no intestino médio também foram encontrados (ALIM et al, 2009). HICPL-A, uma cisteíno protease de *H. Longicornis* do tipo catepsina L, foi caracterizada e observou-se uma regulação positiva dos seus transcritos durante a hematofagia, além da capacidade da protease recombinante degradar hemoglobina na faixa de pH entre 3.2 e 5.6 (YAMAJI et al, 2009a). Em *I. ricinus* uma catepsina L (IrCL1) foi descrita com um importante papel nas fases iniciais da digestão da hemoglobina. Além disso, foi observado que o silenciamento do gene desta proteína no carrapato diminuiu sua capacidade de alimentação, indicando a falta de uma proteína redundante para esta função (FRANTA et al, 2011). A digestão das proteínas do hospedeiro pelos carrapatos é, de fato,

comandada por uma complexa rede de cisteíno e aspártico peptidases que atuam em conjunto para degradação da proteína em diferentes níveis. Este dado foi obtido a partir da inibição seletiva de proteases do intestino de *I. ricinus* (SOJKA et al, 2008).

Vários trabalhos mostram a participação de cisteíno proteases na embriogênese do carrapato. Durante esta fase, os carrapatos dependem de substâncias de reserva do vitelo, principalmente de vitelina. A hidrólise ocorre em ambiente ácido em organelas do tipo lisossomais, onde estão localizadas a vitelina e as enzimas proteolíticas (SOJKA et al, 2011). Uma aspártico-peptidase do tipo catepsina L foi relacionada com o processamento do vitelo. Foi observado que esta enzima está primeiramente sob a forma zimogênica e é ativada em pH ácido (FAGOTTO, 1999a; 1999b). Em outro trabalho, uma cisteíno peptidase degradadora de vitelina (VTDCE) foi identificada em ovos de *R. microplus* (SEIXAS et al, 2003; 2010). Outra cisteíno peptidase da larva da mesma espécie de carrapatos (RmLCE) também é capaz de degradar vitelina (ESTRELA et al, 2007). É sugerido que a VTDCE é transferida da teleógina para o ovo e que a RmLCE é expressa pela larva para completar a degradação dos peptídeos residuais da vitelina, contribuindo para o aporte nutricional da larva antes do início da sua alimentação.

1.4 Regulação de proteases

As proteases catalisam reações de hidrólise irreversíveis, por isto, precisam ser estritamente reguladas. A atividade das proteases pode ser controlada por diversos mecanismos, como a regulação da expressão gênica, ativação da sua forma inativa, inibição por inibidores endógenos, localização em compartimentos celulares, degradação e modificações pós-traducionais.

Os mecanismos transcricionais que regulam a expressão gênica de muitas proteases ainda não é totalmente conhecido. No entanto, sabe-se que para algumas proteases uma

variedade de hormônios, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas controlam sua expressão (OVERALL & LOPEZ-OTIN, 2002). A maioria dos inibidores de protease endógenos são proteínas, com exceção de alguns microrganismos e plantas que produzem pequenos inibidores não-proteicos (LOPEZ-OTIN & BOND, 2008; HAFEZ & MOHAMED, 1983). O número de inibidores endógenos é consideravelmente menor do que o número de proteases (PUENTE & LOPEZ-OTIN, 2004). Esse desequilíbrio pode ser explicado pois esses inibidores são capazes de regular a atividade de mais de um tipo de protease, diminuindo a quantidade necessária para regular todas as proteases. Todos esses mecanismos devem operar de maneira coordenada para que os substratos sejam processados no momento e no ambiente corretos, prevenindo o organismo de danos provocados pela ação incontrolada destas enzimas.

1.4.1 Inibidores de cisteíno proteases

Assim como as proteases, os inibidores de proteases estão classificados em clãs, que possuem uma ou várias famílias com relação evolutiva. Essa relação é determinada a partir da semelhança da estrutura terciária da proteína. Cada uma das 86 famílias existentes agrupa inibidores com similaridade ao longo da sua sequência de aminoácidos ou, pelo menos, na região responsável pela inibição. Uma família pode conter um único inibidor se não houver homólogos conhecidos. O contrário, a presença do mesmo inibidor em mais de uma família, também pode acontecer se este inibidor possuir domínios que se enquadram em diferentes famílias (RAWLINGS et al, 2014).

As cistatinas pertencem à família I25, e compreendem uma grande família de inibidores reversíveis que inibem cisteíno proteases principalmente da família C1 (papaína) e alguns membros das famílias C13 (legumainas) e C2 (calpainas; DUBIN, 2005). A família I25 é dividida em três subfamílias: I25A, I25B e I25C de acordo com a similaridade das

sequências. Uma segunda classificação, baseada nas características gerais da molécula, como a massa molecular, localização fisiológica, presença de regiões conservadas e ligações dissulfeto, agrupa as cistatinas em tipo 1, 2 e 3. As do tipo 1 são as de baixa massa molecular, com cerca de 11 kDa, consistem em uma única cadeia polipeptídica de 100 resíduos, aproximadamente. Não possuem ligações dissulfeto e apenas alguns membros são glicosilados (NI et al, 1997; CORNWALL & HSIA, 2003). Possuem estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura (TURK & BODE, 1991). As cistatinas do tipo 1 possuem três regiões conservadas: a sequência QVVAG, localizada ao centro da sequência de aminoácidos da proteína, um resíduo de glicina, na região N terminal e a dupla leucina-prolina na região C terminal. Essas regiões sofrem pequenas variações entre as cistatinas, mas em todas elas esses três motivos se unem durante o dobramento da proteína para formar o domínio que interage com o sítio ativo e inibe a atividade da protease (BODE et al, 1988). As cistatinas do tipo 2 são um pouco maiores, com massa molecular de aproximadamente 13 kDa, contendo cerca de 120 aminoácidos. Elas são caracterizadas pela presença de duas ligações dissulfeto em posições conservadas da região C-terminal, além de outras três outras regiões conservadas: um resíduo de glicina na região N-terminal, o motivo Q-X-V-X-G localizada ao centro da sequência de aminoácidos e o par prolina-triptofano na região C-terminal. A maioria delas não sofre glicosilação, apesar das cistatinas E e F serem glicosiladas. As cistatinas do tipo 2 são sintetizadas com um peptídeo-sinal e se encontram, normalmente, em fluidos extracelulares, como saliva, sêmen e urina (TURK & BODE, 1991; BODE et al, 1988; GRUBB et al, 1983). O terceiro grupo, as do tipo 3, compreende cistatinas de elevada massa molecular, entre 68 e 120 kDa, e contém três sítios de glicosilação e 8 ligações dissulfeto. Essas proteínas são estáveis em altas temperaturas e em pHs variáveis (TURK et al, 1991). Elas possuem três domínios inibitórios. Somente dois domínios

funcionam como inibidores de cisteíno proteases, ligando-se a duas moléculas de proteases do tipo papaína simultaneamente (CADENA & COLMAN, 1991). O segundo domínio pode, alternativamente, ligar-se a calpaínas (SALVESEN et al, 1986).

A região N-terminal que contém a glicina se une com dois loops (L1 e L2) formados pelos outros dois domínios conservados. Essas três regiões formam uma estrutura complementar ao sítio ativo da cisteíno protease, ligando-se de maneira similar ao substrato. Os loops 1 e 2 interagem com os resíduos da região mais larga da cavidade catalítica, enquanto que a glicina da alça N-terminal interage com os resíduos mais internos da cavidade, próximo aos resíduos catalíticos, impedindo a entrada do substrato (BODE et al, 1988; KOLODZIEJCZYK et al, 2010; SALAT et al, 2010).

1.4.1.1 Inibidores de cisteíno proteases na fisiologia do carrapato

Durante os últimos anos, diversas cistatinas de diferentes espécies de carrapatos foram identificadas e caracterizadas, a maioria delas do tipo 2. Elas têm sido detectadas na saliva e em diferentes tecidos do parasita, estando relacionadas com a fisiologia da alimentação, embriogênese e evasão da resposta imune do hospedeiro (YAMAJI et al, 2009; KARIM et al, 2005; KOTSYFAKIS et al, 2007). Além disso, o transcriptoma da glândula salivar de *I. scapularis*, *I. ricinus*, *Ornithodoros parkeri*, *Amblyomma variegatum*, revelaram a presença de transcritos de cistatinas (VALENZUELA et al, 2002; RIBEIRO et al, 2006; CHMELAR et al, 2008; FRANCISCHETTI et al, 2008; RIBEIRO et al, 2011).

Em *I. scapularis*, duas cistatinas presentes na saliva foram caracterizadas (Sialostatina L e L2; KOTSYFAKIS et al, 2007). Ensaio de inibição mostram que elas possuem afinidade pelas catepsinas L e S, duas peptidases envolvidas no processamento de antígenos pelas células dendríticas. Estudos posteriores revelaram que a maturação das células dendríticas é prejudicada significativamente na presença de Sialostatina L, (SA-

NUNES et al, 2009) e que a imunização utilizando esta proteína como antígeno resultou na diminuição da alimentação do carrapato (KOTSYFAKIS et al, 2008). Além disso, a Sialostatina L é capaz de inibir a migração de neutrófilos durante a inflamação e a proliferação de células T CD4 e de células T citotóxicas (KOTSYFAKIS et al, 2006). Observou-se também, que a Sialostatina L2 é regulada positivamente durante a fase de alimentação (KOTSYFAKIS et al, 2007). Recentemente foi demonstrado que essa cistatina suprime a atividade do IFN- β , podendo aumentar a quantidade de patógenos transmitidos pela saliva do parasita (LIESKOVSKÁ et al, 2015)

Em 2005, Karim et al, descobriram uma nova cistatina na glândula salivar de *A. americanum*, possuindo 99% de identidade com a sequência de aminoácidos da Sialostatina L de *I. scapularis*. A atividade imunomodulatória dessa cistatina foi testada através de silenciamento do gene no carrapato. Somente 20% dos carrapatos que tiveram a cistatina silenciada completaram sua alimentação em tempo normal e metade desses carrapatos ganharam menos peso do que os carrapatos do grupo controle. O mesmo hospedeiro infestado com os carrapatos silenciados foi utilizado para uma segunda infestação com carrapatos selvagens. O resultado observado foi uma elevada resposta imune do hospedeiro contra carrapatos da última infestação, diminuindo sua capacidade de alimentação. Esses resultados sugerem uma habilidade imunossupressora da cistatina da saliva conservada em duas espécies diferentes de carrapatos (KARIM et al, 2005).

Em *H. longicornis*, três cistatinas (Hlcyst-2, Hlcyst-3 e HISC-1) foram identificadas em diferentes tecidos (ZHOU et al, 2006; 2010; YAMAJI et al, 2009b). Análises bioquímicas confirmaram que essas cistatinas são potenciais inibidores de cisteína proteases do tipo papaína e catepsina L (ZHOU et al, 2006; 2010; YAMAJI et al, 2009b). Hlcyst-2 é capaz de impedir a degradação de hemoglobina através da inibição de HICPL-A, uma

catepsina intracelular de *H. longicornis*. Hlcyst-2 está presente em todos os estágios do desenvolvimento e sua expressão aumenta gradualmente desde a larva até o adulto. A transcrição do gene de Hlcyst-2 no intestino aumenta até o quarto dia de alimentação, seguido pela diminuição dos níveis de transcrição no final da alimentação (ZHOU et al, 2006). Além de participar da fisiologia durante a alimentação, essa cistatina pode estar relacionada com a imunidade inata do parasita, pois os transcritos do gene de *Hlcyst-2* foram regulados positivamente após inoculação de LPS em *H. longicornis* adultos ou de *Babesia gibsoni* em larvas desta espécie (ZHOU et al, 2006).

Dois genes que codificam cistatinas (Om-cystatin 1 e Om-cystatin-2) em *Ornithodoros moubata* foram isolados de uma biblioteca de cDNA específica de intestino. Ambas são reguladas negativamente pela alimentação. Om-cystatin-1 é expressa principalmente no intestino, enquanto que Om-cystatin-2 também é encontrada em outros tecidos. A especificidade dessas cistatinas recombinantes foi avaliada para cisteíno proteases de mamíferos e para cisteíno peptidases endógenas, presentes no intestino do carrapato. Como resultado, observou-se elevada inibição das catepsinas B e H. A Om-cistatina 2 inibiu com maior afinidade as catepsinas L, C e S (GRUNCLOVA et al, 2006). Além disso, ela foi capaz de suprimir a produção de TNF- α e IL-12 por células dendríticas ativadas por LPS *in vitro* e a proliferação de células T CD4 antígeno específicas. As catepsinas L e S estão envolvidas na degradação da cadeia invariante do MHC de classe II em mamíferos, e são responsáveis pelo processamento antigênico pelas células apresentadoras de antígenos. Esses resultados sugerem a relação desta cistatina com a modulação da resposta imune do hospedeiro (SALAT et al, 2010).

A proteína Rmcystatin-3 é uma cistatina de *R. microplus* recentemente caracterizada (LU et al, 2014). Sua forma recombinante foi capaz de inibir a catepsina L e B e BmCL1, uma

catepsina L de *R. microplus*. Análises por western blot e PCR quantitativo revelaram a presença de Rmcystatin-3 no corpo gorduroso, glândula salivar e hemócitos. O silenciamento de *Rmcystatin-3* em carrapatos infectados diminuiu sua capacidade de controlar infecção por *Escherichia coli*, sugerindo uma modulação negativa da resposta imune do parasita.

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é obter a cistatina de *Ixodes ovatus* *JpIocys2a* de forma recombinante para caracterização do seu perfil inibitório e antigênico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Carrapatos fêmeas da espécie *R. microplus* totalmente e parcialmente ingurgitadas foram coletadas de bovinos da raça Hereford para dissecação dos tecidos. Fêmeas parcialmente ingurgitadas pesando entre 25 e 60 mg foram coletadas manualmente de bezerros (GONSIOROSKI et al., 2012). Coelhos da linhagem Nova Zelândia e Bovinos da raça Herford foram mantidos na faculdade de veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os experimentos foram aprovados e conduzidos de acordo com o comitê de ética em experimentação animal da mesma universidade.

3.2 Clonagem do gene *JpIocys2a*

Para clonagem da sequência nucleotídica de *JpIocys2a*, os primers 5' GACTAGTCGCCAGCACGATGGCT-3' (*forward*) e 5'-TGTCATTTAACATGCGGCTGACGTC-3' (*reverse*) foram projetados a partir de sequências de cistatina de *I. scapularis* depositadas no banco de dados TIGR (TC51659). Uma ORF (*Open Read Frame*) com 423 pares de bases foi amplificada a partir do RNA de ovário de *I. ovatus* por RT-PCR e clonada no vetor pGEM-T. Para a clonagem da região

codificante da sequência da proteína madura em vetor de expressão, o plasmídeo PGEM-JpIocys2a foi utilizado para amplificação com os primers 5'-TTTTTGGATCCGGGTCGGCGAGCAGGTC-3' (*forward*) e 5'-AAAAAGAATTCCTAGACATTATTAGGAGCTTCGCAGTGGTAG-3' (*reverse*).

Os produtos da PCR foram hidrolisados utilizando as enzimas de restrição BamHI e EcoRI e submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8%. O fragmento de 423 pares de bases foi purificado utilizando o *kit* GeneClean II e ligado ao plasmídeo pGEX-4T-1 localizando-se a montante do gene da proteína de fusão Glutathione S-transferase (GST). O plasmídeo pGEX-4T-1-JpIocys1a foi utilizado para transformação da bactéria eletrocompetente *E. coli* cepa XL1 Blue. As células transformadas foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) sólido contendo ampicilina e cloranfenicol (ambos 50 ug/mL). O plasmídeo foi purificado e a correta clonagem foi confirmada através de sequenciamento.

3.3 Análises *in silico*

A análise da sequência codificante de *JpIocys2a*, a predição da sequência de aminoácidos e os alinhamentos a partir do algoritmo ClustalW foram conduzidos utilizando o *software* BioEdit versão 7.2.5 (Hall, 1999). O peptídeo-sinal foi predito utilizando o *software* SignalP 4.1 (PETERSEN et al, 2011). As regiões antigênicas foram preditas utilizando o algoritmo Jameson-Wolf do *software* Lasergene, versão 7.0 (Jameson and Wolf, 1998).

3.4 Síntese do peptídeo

Para o direcionamento da resposta imune a uma região específica das cistatinas analisadas, foi sintetizado um peptídeo de 14 aminoácidos baseado na sequência da proteína JpIocys2a (STQpep). A análise antigênica das cistatinas e a porcentagem de identidade entre *JpIocys2a* e outras cistatinas de *R. microplus* (*BrBmcys2b* [GenBank: KC816580],

BrBmcys2c [GenBank: KC816581] e *Rmcystatin-3* [GenBank: AIX97454]) foram usadas para selecionar a região do peptídeo. O peptídeo foi sintetizado pela Dra. Maria Aparecida Juliano, do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), SP, Brasil.

3.5 Produção de soro anti-STQpep

Para avaliar a antigenicidade cruzada entre JpIocys2a (GenBank: KP253747) e as cistatinas nativas e recombinantes (rBrBmcys2b e rBrBmcys2c) de *R. microplus* um soro anti-STQpep foi produzido através de imunização de coelhos da raça New Zeland. Foram realizados quatro inóculos com 500 µl da solução contendo o peptídeo (1µg/µl) conjugado à proteína KLH emulsionados com 500 µl de Marcol/Montanide.

3.6 Expressão e purificação de rJpIocys2a

A bactéria *E. coli* da cepa RIL foi transformada por choque térmico com o plasmídeo pGEX-4T-1-JpIocys2a. A proteína recombinante GST-JpIocys2a foi expressa em meio LB com 0,1 mM de IPTG durante 24 horas a 37°C. O cultivo foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sedimento foi ressuspendido em tampão fosfato-salino (PBS). Para lise celular a suspensão foi sonicada por cinco vezes durante 30 segundos a 40 MHz em banho de gelo. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4°C.

A fração solúvel contendo rGST-JpIocys2a foi purificada utilizando a resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) e eluída com tampão Tris-HCl 50 mM, glutathione 10 mM em pH 8,0. A rGST-JpIocys2a purificada foi dialisada em tampão de hidrólise (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,3) e hidrolisada com trombina (0,01 u/µg) no sítio de hidrólise existente entre a proteína de fusão e a rJpIocys2a. Uma segunda purificação foi realizada para retirar a rGST da amostra. Para isto, a resina

Glutathione Sepharose 4B foi adicionada à amostra, centrifugada a 500 g por 30 segundos e a proteína rJpIocys2a foi recuperada no sobrenadante. A concentração das proteínas foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (*kit* BCA; Thermo Scientific Pierce) de acordo com o manual de instruções. Para controle negativo nos ensaios enzimáticos, o vetor pGEX-4T-1 vazio foi utilizado para transformação da bactéria competente e a proteína rGST foi expressa e purificada sob as mesmas condições descritas anteriormente.

3.7 Ensaios enzimáticos

As variáveis das reações enzimáticas como concentração de enzima, substrato e tampão adequado foram padronizadas. Para cada enzima, diferentes concentrações de substrato entre 0,1 e 10 vezes o K_m foram utilizadas durante o ensaio de inibição. A constante de dissociação (K_i) de rJpIocys2a foi estimada usando diferentes catepsinas para determinar seu perfil inibitório. As enzimas foram pré-incubadas com a cistatina recombinante purificada, em concentrações que variaram entre 10 a 500 nM no tampão adequado para cada enzima, durante 15 minutos. O substrato específico da protease foi adicionado para estimar a atividade residual da enzima. A concentração das enzimas (Sigma) estão presentes na Tabela 1. Para as catepsinas C bovina (código do produto: C8511) e L humana (código do produto: C6854) foi utilizado tampão acetato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 100 mM, EDTA 1 mM, e Triton X-100 0,005%, pH 5,5. Para a catepsina B bovina foi utilizado o tampão acetato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 60 mM e EDTA 1 mM, pH 5,5. Para a catepsina G humana (código do produto: C4428) foi utilizado o tampão HEPES 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5. Os substratos utilizados foram os seguintes: Z-Phe-Arg-MCA ($K_m = 0,02$ mM) para catepsina L; Z-Arg-Arg-pNA ($K_m = 0,12$ mM) para catepsina B; Gly-Phe-pNA ($K_m = 1,87$ mM) para catepsina C; N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ($K_m = 0,67$ mM); os K_m foram consultados no *Braunschweig Enzyme Database*

(disponível em <http://www.brenda-enzymes.org/>) para catepsina G. A cinética da reação de degradação dos substratos cromogênicos (absorção óptica a 405 nm) e fluorogênicos (emissão em 370 e excitação em 460 nm) foi monitorada no leitor espectrofotométrico para microplacas (*Spectramax Microplate Reader, Molecular Devices Corporation*) por 15 minutos com intervalos de 20 segundos. Para determinação da constante de dissociação foi usada a equação de regressão não linear (MORRISON, 1969), utilizando Graphpad Prism versão 5.0 para Windows.

3.8 Extração dos tecidos de carrapato

Glândulas salivares, ovário, intestino de partenóginas e teleóginas e larvas foram mantidos em gelo, embebidos em tampão fosfato 10 mM, pH 7,2 e lisados usando gral e pistilo apropriados. O homogeneizado foi centrifugado a 16.000 g por 15 minutos a 4 °C para remoção do material insolúvel e o sobrenadante coletado. Os extratos proteicos foram preparados de acordo com a metodologia descrita previamente por da Silva Vaz Jr et al, (1998). Para coleta da hemolinfa, teleóginas de *R. microplus* foram lavadas em álcool 70%, fixadas em placa de Petri e mantidas a 4 °C. A superfície da cutícula foi cortada com uma lâmina e a hemolinfa recuperada e armazenada a -20 °C. A saliva foi coletada de fêmeas totalmente ingurgitadas após injeção com pilocarpina, como previamente descrito por Tirloni. et al (2014).

3.9 SDS-PAGE e western blot

A produção da cistatina recombinante e a capacidade do soro anti-STQpep reconhecer cistatinas de *R. microplus* recombinantes e nativas, foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot*. Para as análises por *western blot*, a cistatina recombinante (1 µg de proteína/canaleta), a saliva (20 µg de proteína/canaleta), a hemolinfa (60 µg de proteína/canaleta) e os extratos dos tecidos (150 µg de proteína/canaleta) foram submetidos

a eletroforese em gel de poliacrilamida 14% e, em seguida, transferidos para membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado 5% em PBS. Para a detecção da proteína recombinante, a membrana foi incubada com soro de coelho anti-GST de *H. longicornis* (anti-GSTH1; 1:2000), conforme Parizi et al (no prelo). Para detecção da proteína nos tecidos nativos a membrana foi incubada com soro de coelho anti-STQpep (1:50). Após incubação com anticorpo primário, anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (1:5000) foi utilizado como anticorpo secundário. A revelação foi realizada com NBT (nitro blue tetrazolium) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfatase, Sigma) em PBS.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação e análise da sequência nucleotídica de *JpIocys2a*

A sequência nucleotídica do gene *JpIocys2a* possui uma fase de leitura aberta de 423 pares de bases e a sequência predita de aminoácidos contém um peptídeo-sinal com sítio de hidrólise entre os aminoácidos 18 e 19 e quatro resíduos de cisteína (Figura 1). A proteína sem peptídeo-sinal tem uma massa molecular predita de 13,7 kDa. O resíduo de glicina (G) da região N-terminal, os motivos QxVxG e PW da região C-terminal são característicos das cistatinas do tipo 2, e se mostraram conservados em *JpIocys2a*. O domínio inibitório SND que atua sobre legumainas/asparaginil endopeptidases encontrados na cistatina C humana está ausente em *JpIocys2a*, assim como em outras cistatinas de carrapato.

```

ATGGCTTTCTTCAAGGTTGCCGTATTCCTGGTTTGTGTGGTCCTCGCAGCGGGCCGGGTCG
M A F F K V A V F L V C V V L A A A G S
GCGAGCAGGTCAAAGAGGGCCCTGGTCGGAGGCTGGAAGACGCAGGACCCAACCAACCCC
A S R S K R A L V G G W K T Q D P T N P
AAGTTCGAGAATCTGGCGCACTACGCAGTGTCTACCCAAGTCGAAGGTCGAGAATACTAC
K F E N L A H Y A V S T Q V E G R E Y Y
GACACGGTCCTCGAGCTCTTGGAGGTGCAGACTCAGATTGTGGCCGGCGTGAAGTACAAG
D T V L E L L E V Q T Q I V A G V N Y K
TTGAAGTTTACAACGACTCAATCGACGTGCAAGATCGAAAACCGGGCGTGAATACTCCAAG
L K F T T T Q S T C K I E T G V E Y S K
GAGCTTTGCCAGCCTAAGACAAACAAGTTCAATCTGTATGCACCGCAATCATCTACACA
E L C Q P K T N K V Q S V C T A I I Y T
GTTCCATGGCAGAACATCAAGCGGGTTTTGTCTTACCCTGCGAAGCTCCTAATAATGTC
V P W Q N I K R V L S Y H C E A P N N V
TAG
*
```

Figura 1: Sequência nucleotídica e predição da sequência de aminoácidos de

JpIocys2a. O peptídeo-sinal está sublinhado. Os resíduos de cisteína estão em cinza e os motivos conservados PI (G), PII (QxVxG) e PIII (PW) estão destacados por caixas.

4.2 Antigenicidade de cistatinas *in silico* e seleção do peptídeo

O alinhamento entre as sequências preditas de aminoácidos da JpIocys2a e outras cistatinas de *R. microplus* mostrou regiões conservadas e antigênicas (Figura 2). O peptídeo de sequência STQVEGREYYDTVL baseado na proteína JpIocys2a (STQpep) foi selecionado para ser sintetizado. A escolha do peptídeo está de acordo com a análise de regiões com maior similaridade e, ao mesmo tempo, alta antigenicidade entre as cistatinas.

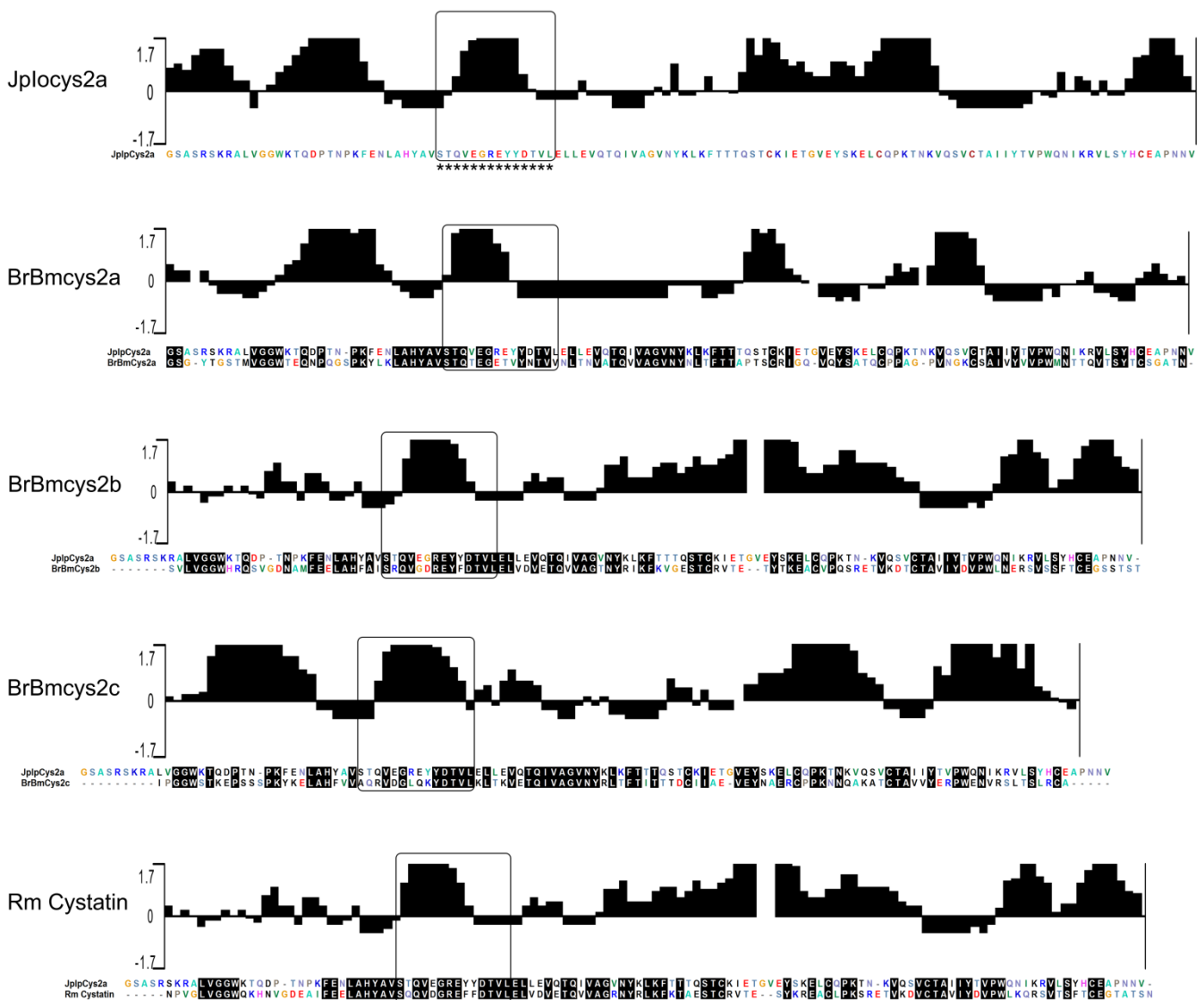


Figura 2: Regiões antigênicas e conservadas entre cistatinas de carrapatos e seleção do

peptídeo de JpIocys2a. O gráfico mostra o índice de antigenicidade das cistatinas, que foi predito usando o algoritmo Jameson-Wolf. Os alinhamentos mostram regiões conservadas entre JpIocys2a e outras cistatinas de *R. microplus* (BrBmcys2a, BrBmcys2b, BrBmcys2c e Rm cystatin). As caixas em preto indicam regiões conservadas e, ao mesmo tempo, antigênicas entre as cistatinas analisadas. Os asteriscos indicam a região da proteína selecionada para síntese do peptídeo.

4.3 Produção da cistatina recombinante.

A proteína recombinante GST-JpIocys2a foi expressa de forma solúvel em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade. A proteína conjugada foi hidrolisada por trombina (Sigma) e a rJpIocys2a após purificação foi recuperada (Figura 3). O SDS-PAGE mostrou que a proteína conjugada rGST-JpIocys2a possui uma massa molecular de aproximadamente 45 kDa enquanto que a cistatina possui pouco menos que 15 kDa. Este resultado está de acordo com o a massa molecular estimada *in silico* (13,7 kDa). A análise por *western blot* mostrou que a rGST-JpIocys2a foi reconhecida pelo soro contendo anticorpo anti-GSTH1, confirmando a identidade da proteína expressa.

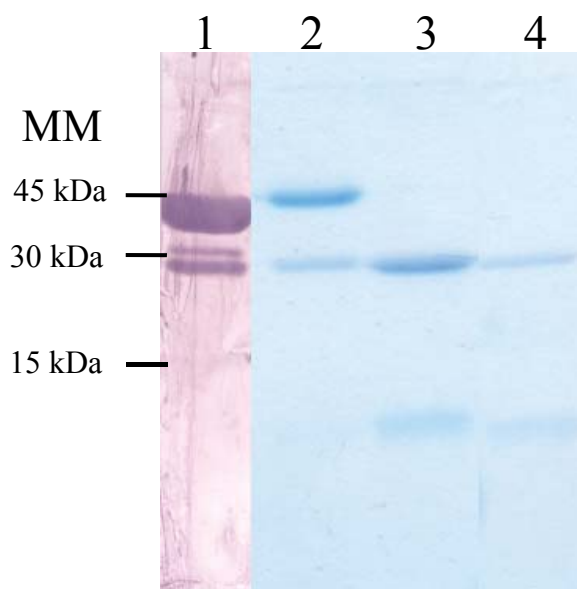


Figura 3: SDS-PAGE e western blot da produção de rJpIocys2a. Western blot da rGST-JpIocys2a purificada identificada com anticorpo anti-GSTH1 (1). SDS-PAGE: rGST-JpIocys2a purificada antes (2) e após a clivagem com trombina (3) (rGST e JpIocys2a separadas); rJpIocys2a purificada (4). Massa molecular (MM).

4.4 Perfil inibitório de rJpIocys2a

Os ensaios enzimáticos foram realizados para caracterizar a especificidade da cistatina rJpIocys2a para as diferentes catepsina (Tabela 1). rJpIocys2a foi capaz de modular a atividade da catepsina B, C e L com diferentes níveis de afinidade, apresentando menor K_i para a catepsina L. A catepsina C, no entanto, foi inibida com menor eficiência, apresentando um K_i maior que 1 μ M. A catepsina G, uma serino protease, não foi inibida por rJpIocys2a.

Tabela 1: Valores das constantes de dissociação (K_i) de rJpIocys2a para diferentes proteases

Enzima	Família	Concentração da enzima	K_i (nM)
Catepsina B ¹	Cisteíno protease	0.500 μ M	154.70 \pm 106.71
Catepsina C ¹	Cisteíno protease	0.160 μ M	> 1 μ M
Catepsina L ²	Cisteíno protease	0.043 μ M	4.39 \pm 1.76
Catepsina G ²	Serino protease	0.100 μ M	n.i.

n.i. não inibida na presença de 0.5 μ M de rJpIocys2a;

¹Catepsina bovina;

²Catepsina humana.

4.5 Antigenicidade cruzada entre STQ-pep e cistatinas de *Rhipicephalus microplus*

O reconhecimento de cistatinas nativas de *R. microplus* pelo soro anti-STQpep foi usado para determinar a antigenicidade cruzada entre a cistatinas de *I. ovatus* e *R. microplus*. Esse soro foi capaz de reconhecer proteínas de mesma massa molecular que as cistatinas nas glândulas salivares de fêmeas de *R. microplus* totalmente e parcialmente ingurgitadas. Além disso, também reconheceu rBrBmcys2b (IMAMURA, 2013), uma cistatina recombinante de *R. microplus* e a própria rJpIocys2a (Figura 4). O soro do coelho pré-imune não foi capaz de reconhecer nenhuma dessas proteínas (dados não mostrados).

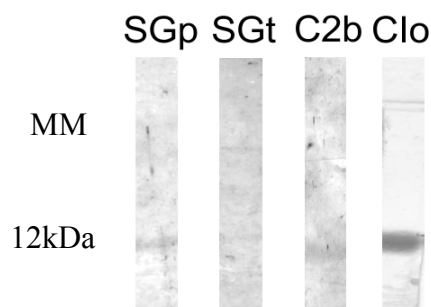


Figura 4: Antigenicidade cruzada entre STQ-pep e cistatinas de *R. microplus*. Através de *western blot* rJpIocys2a, cistatina recombinante de *R. microplus* e cistatinas nativas dos tecidos de *R. microplus* foram analisadas utilizando soro anti-STQpep. SGt, glândulas salivares de fêmeas totalmente ingurgitadas; SGp, glândulas salivares de fêmeas parcialmente ingurgitadas; C2b, rBrBmcys2b; Clo, rJpIocys2a. MM: massa molecular.

5. DISCUSSÃO

A identificação e caracterização de proteínas que desempenham um papel importante durante o desenvolvimento do carrapato pode auxiliar no desenvolvimento racional de novas vacinas contra este parasita (MULENGA et al, 2000). Diversos grupos de pesquisa dedicam-se a compreender os mecanismos de proteínas envolvidas em processos fisiológicos no carrapato, a maioria deles busca utilizar essas moléculas como alvos para o seu controle. Entre as diversas proteínas estudadas estão as cistatinas. Experimentos de alimentação artificial com anticorpos anti-cistatina e RNAi em carrapatos revelaram que a interferência na atividade inibitória destas proteínas prejudica a alimentação e o desenvolvimento do carrapato (KOTSYFAKIS et al, 2006;2007; ALVAREZ-FERNANDEZ et al, 1999), pois as cistatinas podem regular enzimas específicas que atuam em diferentes momentos da digestão e a interferência na regulação através da inibição da cistatina poderia prejudicar a homeostase deste processo, como por exemplo durante a digestão da hemoglobina (FRANTA et al, 2010).

A literatura referente ao carrapato *I. ovatus* fornece poucas informações sobre a biologia desta espécie. Apesar de existirem dados relacionados à infecção por patógenos, (TAKEDA et al, 1998; SHIBATA et al, 2000; KAWAHARA et al, 2004; SAITO-ITO et al,

2004; YANO et al, 2005; ZAMOTO-NIIKURA et al, 2012; CHAO et al, 2014), a identificação e caracterização de proteínas desse carrapato ainda não foi realizada, portanto, pouco se sabe sobre a participação de proteínas em processos fisiológicos e sua utilização como antígeno vacinal nesta espécie. Neste sentido, este trabalho visa contribuir para o conhecimento da biologia desta espécie e do desenvolvimento de potenciais alvos para o controle dos carrapatos.

Através da clonagem e sequenciamento do gene *JpIocys2a* foi possível prever a estrutura primária da proteína. As análises da sequência de aminoácidos *in silico* revelaram uma proteína com massa molecular de 13,7 kDa, contendo peptídeo-sinal, quatro cisteínas conservadas que provavelmente participam de ligações dissulfeto e os motivos conservados que foram o domínio inibitório (Figura 1). De acordo com estas características é possível classificar a proteína *JpIocys2a* como sendo uma cistatina do tipo 2. Uma característica interessante apresentada por cistatinas de carrapatos, incluindo *JpIocys2a*, é a ausência do motivo SND, relacionado com a inibição de legumainas (ALVAREZ-FERNANDEZ et al, 1999). Esse motivo é conservado em mamíferos (ALVAREZ-FERNANDEZ et al, 1999), mas parece não se manter conservado em cistatinas de artrópodes, apesar de diversas cisteíno proteases do tipo legumaina participarem de processos fisiológicos em carrapatos (ALIM et al, 2007; 2009)

Neste trabalho, um peptídeo baseado na sequência de *JpIocys2a* foi sintetizado a fim de avaliar a antigenicidade cruzada entre esta cistatina e outras cistatinas de *R. microplus*. Para que haja antigenicidade cruzada, é necessário que o anticorpo gerado contra o epítipo de uma proteína reconheça epítipos iguais ou similares de outra proteína. Neste sentido, é possível identificar regiões que possivelmente gerem antigenicidade cruzada entre duas ou mais proteínas. Na Figura 2, o alinhamento entre as sequências de aminoácidos de *JpIocys2a*

e de outras cistatinas de *R. microplus* indicam regiões conservadas (destacadas em preto). É provável que sequências conservadas de aminoácidos sejam capazes de induzir uma resposta imune com antigenicidade cruzada, no entanto, estas regiões precisam estar expostas e acessíveis para o anticorpo durante uma exposição natural da proteína. Além disso, quando utilizado na imunização, o antígeno não deve induzir o reconhecimento de proteínas próprias do hospedeiro. Neste sentido, as regiões mais conservadas entre as cistatinas de modo geral estão localizadas nos motivos responsáveis pela inibição (BROWN & DZIEGIELEWSKA, 1997; OCHIENG & CHAUDHURI, 2010; SCHWARZ et al, 2012). Deste modo, foi identificada uma região baseada na sequência de aminoácidos de JpIocys2a, que contempla a característica de possuir similaridade entre JpIocys2a e outras cistatinas de *R. microplus*, ser antigênica, de acordo com a análise pelo algoritmo Jameson Wolf e, ainda, estar localizada fora do sítio ativo (Figura 2). Além disso, quando a sequência do peptídeo foi comparada com as sequências depositadas no Genbank, utilizado a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (algoritmo BLASTp), foram encontradas sequências de proteínas de *I. scapularis*, *O. moubata*, *R. microplus* e *I. ricinus* e nenhuma de mamífero, sugerindo que esta proteína pode gerar antigenicidade cruzada contra estas espécies e, provavelmente, não produzir resposta imune contra o próprio hospedeiro.

Os anticorpos gerados contra o peptídeo STQ-pep foram capazes de reconhecer a proteína da qual foi baseado e, ainda, cistatinas da glândula salivar de fêmeas de *R. microplus* parcialmente e totalmente ingurgitadas, além de uma cistatina recombinante da mesma espécie de carrapato (Figura 4). A imunização com o peptídeo direciona a resposta imune para o local desejado, assim, ao invés de utilizar a proteína JpIocys2a inteira para imunização, a seleção de uma região que possui as características adequadas pode aumentar a antigenicidade cruzada entre as proteínas, direcionando o reconhecimento de epítomos

imunodominantes e conservados. A imunização com peptídeos sintéticos foi utilizada para direcionar a resposta imune a sítios específicos da proteína subolesina (MANZANO-ROMÁN et al, 2015). Experimentos anteriores demonstraram que o silenciamento do gene da subolesina em *O. erraticus* e *O. moubata* por RNAi foi capaz de diminuir a oviposição em 95%, enquanto que a alimentação destes carrapatos em animais imunizados com a proteína inteira resultou em uma diminuição da oviposição entre 5 e 25% (MANZANO-ROMÁN et al, 2012). Os autores sugeriram que a diminuição da eficiência pelo experimento de imunização poderia estar relacionada ao direcionamento da resposta imune principalmente para epítomos imunodominantes não protetores. Neste sentido, peptídeos sintéticos, que não eram reconhecidos após imunização com a proteína inteira, foram utilizados em um experimento de vacinação contra *O. erraticus* e *O. moubata*, que resultou em uma proteção de 70.1% e 83.1%, respectivamente. Estes dados indicam que os anticorpos gerados a partir da imunização com a proteína inteira neutralizam sítios que não estão relacionados à atividade da proteína e que a utilização de peptídeos pode induzir a geração de anticorpos contra estas regiões, resultando em proteção. A utilização de peptídeos sintéticos como vacina contra o carrapato *R. microplus* já foi testada (PATARROYO et al, 2002). Três peptídeos sintéticos (SBm7462, SBm4912 e SBm19733) baseados na sequência de aminoácidos da proteína Bm86 foram utilizados para imunização de bovinos. Anticorpos gerados contra SBm7462 e SBm4912 mostraram grande reação com a superfície das células epiteliais e no interior de vacúolos digestivos de *R. microplus*. Além disso, quando carrapatos foram desafiados em bovinos imunizados com os peptídeos SBm4912 e SBm7462, reduziram o número e o peso de fêmeas adultas e a capacidade de oviposição. Vacinas baseadas em peptídeos sintéticos são estudadas contra malária (SIRIMA, et al, 2009), hepatite C (EL-AWADY et al, 2009, 2010), vírus da febre amarela (TANG et al,

2013) e papiloma vírus (VAN POELGEEST et al, 2013). Estratégias que usam proteínas de uma espécie para proteger contra outra espécie também são utilizadas. Quando GST-HI foi utilizada em experimento de imunização em bovino contra infestação por *R. microplus* foi observada diminuição de 50% no número de fêmeas ingurgitadas (PARIZI et al, 2011). Além disso, anticorpos gerados contra as proteínas GST e CRT de *H. longicornis* são capazes de reconhecer proteínas nativas e recombinantes de *R. microplus* (PARIZI et al, 2009; 2011).

Para avaliar o perfil inibitório de rJpIocys2a, foram selecionadas três cisteíno proteases envolvidas na degradação proteolítica da hemoglobina em carrapatos (HORN et al, 2009; LYO et al, 2012). A cistatina rJpIocys2a foi capaz de inibir as catepsinas B, C e L em diferentes níveis, com menor K_i para as catepsinas L e B. Em *I. ricinus* essas catepsinas participam da degradação da hemoglobina em etapas iniciais, gerando fragmentos considerados grandes, enquanto que a catepsina C participa da hemólise nas fases finais, gerando pequenos peptídeos (FRANTA et al, 2010). Neste sentido, a cistatina JpIocys2a poderia participar da regulação da hemólise durante a digestão em *I. ovatus*, com maior importância durante as etapas iniciais da degradação. Além disso, a catepsina L está envolvida com o sistema imune do hospedeiro, regulando a via de apresentação de antígenos pelo MHC classe II (HSING & RUDENSKY, 2005), assim como a degradação da matriz extracelular durante a inflamação (LYO et al, 2012). A atividade da catepsina L, secretada por macrófagos no local da picada do carrapato, pode hidrolisar proteínas responsáveis pela elasticidade da pele e danificar o tecido do hospedeiro naquela região, dificultando a fixação do carrapato durante a alimentação (KOTSYFAKIS et al, 2007). A inibição da catepsina L por cistatinas secretadas na saliva do carrapato poderia ajudar a correta fixação e alimentação do carrapato, uma vez que a inibição dos efeitos de cistatinas por RNAi e vacinação resultaram no aumento da inflamação e rejeição do parasita pela resposta imune do

hospedeiro (LYO et al, 2012; KOTSYFAKIS et al, 2007; 2008). Se JpIocys2a for uma cistatina secretada na saliva de *I. ovatus* ela poderia estar envolvida nesse mecanismo, contribuindo para o sucesso durante a alimentação desta espécie.

Neste trabalho, foi observada uma inibição diferencial para as catepsinas B, L e C, indicando que JpIocys2a poderia estar envolvida em diferentes processos relacionados a estas enzimas, principalmente na degradação da hemoglobina durante as fases iniciais e na modulação da resposta imune do hospedeiro. Além disso, a imunização com peptídeos gerados de forma racional, a partir da seleção de regiões conservadas e antigênicas entre proteínas, pode ser considerada uma estratégia interessante para direcionar a resposta imune do hospedeiro. Através desta estratégia, foi possível observar a geração de antígeno cruzado entre rJpIocys2a e outras cistatinas de *R. microplus*. Esse resultado amplia as possibilidades de investir no desenvolvimento de uma vacina multi-espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J. & IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*, 203: 6-20, 2014.

ABRAHAMSON, M.; ALVAREZ-FERNANDEZ, M. & NATHANSON, C. M. Cystatins. *Proteases and the Regulation of Biological Processes*, 70: 179-199, 2003.

ALIM, M. A.; TSUJI, N.; MIYOSHI, T.; ISLAM, M. K.; HATTA, T. & FUJISAKI, K. Legumains from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* play modulatory roles in blood feeding and gut cellular remodelling and impact on embryogenesis. *International Journal for Parasitology*, 39: 97-107, 2009.

ALIM, M. A.; TSUJI, N.; MIYOSHI, T.; ISLAM, M. K.; HUANG, X. H.; MOTOBU, M. & FUJISAKI, K. Characterization of asparaginyl endopeptidase, legumain induced by blood feeding in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 911-922, 2007.

ALIM, M. A.; TSUJI, N.; MIYOSHI, T.; ISLAM, M. K.; HUANG, X. H.; HATTA, T. & FUJISAKI, K. HILgm2, a member of asparaginyl endopeptidases/legumains in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, is involved in blood-meal digestion. *Journal of Insect Physiology*, 54: 573-585, 2008.

ALMAZAN, C.; BLAS-MACHADO, U.; KOCAN, K. M.; YOSHIOKA, J. H.; BLOUIN, E. F.; MANGOLD, A. J. & DE LA FUENTE, J. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine*, 23: 4403-4416, 2005.

ALMAZAN, C.; LAGUNES, R.; VILLAR, M.; CANALES, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; JONGEJAN, F. & DE LA FUENTE, J. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research*, 106: 471-479, 2010.

ALVAREZ-FERNANDEZ, M.; BARRETT, A. J.; GERHARTZ, B.; DANDO, P. M.; NI, J. A. & ABRAHAMSON, M. Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 19195-19203, 1999.

ANGUITA, J.; RAMAMOORTHY, N.; HOVIUS, J. W. R.; DAS, S.; THOMAS, V.; PERSINSKI, R.; CONZE, D.; ASKENASE, P. W.; RINCON, M.; KANTOR, F. S. & FIKRIG, E. Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+)

ASBOTH, B.; STOKUM, E.; KHAN, I. U. & POLGAR, L. Mechanism of action of cysteine proteinases - oxyanion binding-site is not essential in the hydrolysis of specific substrates. *Biochemistry*, 24: 606-609, 1985

ASTIGARRAGA, A.; OLEAGAPEREZ, A.; PEREZSANCHEZ, R.; BARANDA, J. A. & ENCINASGRANDES, A. Host immune response evasion strategies in *Ornithodoros erraticus* and *O. moubata* and their relationship to the development of an antiargasid vaccine. *Parasite Immunology*, 19: 401-410, 1997.

- BAGYINSZKY, E.; YOUN, Y. C.; AN, S. S. A. & KIM, S. The genetics of Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging*, 9: 535-551, 2014.
- BODE, W. & HUBER, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477: 241-252, 2000.
- BODE, W.; ENGH, R.; MUSIL, D.; THIELE, U.; HUBER, R.; KARSHIKOV, A.; BRZIN, J.; KOS, J. & TURK, V. The 2.0 Å X-ray crystal-structure of Chicken Egg-White Cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *Embo Journal*, 7: 2593-2599, 1988.
- BRAKE, D. K. & DE LEON, A. A. P. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasites & Vectors*, 5: 2012.
- BRANNAN, J. L.; RIGGS, P. K.; OLAFSON, P. U.; IVANOV, I. & HOLMAN, P. J. Expression of bovine genes associated with local and systemic immune response to infestation with the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5: 676-688, 2014.
- BROWN, W. M. & DZIEGIELEWSKA, K. M. Friends and relations of the cystatin superfamily - New members and their evolution. *Protein Science*, 6: 5-12, 1997.
- CADENA, R. A. D. & COLMAN, R. W. Structure and functions of human kininogens. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12: 272-275, 1991.
- CANALES, M.; ALMAZAN, C.; NARANJO, V.; JONGEJAN, F. & DE LA FUENTE, J. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *Bmc Biotechnology*, 9: 2009a.
- CANALES, M.; DE LA LASTRA, J. M. P.; NARANJO, V.; NIJHOF, A. M.; HOPE, M.; JONGEJAN, F. & DE LA FUENTE, J. Expression of recombinant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. *Bmc Biotechnology*, 8: 2008.
- CANALES, M.; ENRIQUEZ, A.; RAMOS, E.; CABRERA, D.; DANDIE, H.; SOTO, A.; FALCON, V.; RODRIGUEZ, M. & DELAFUENTE, J. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac(TM) against cattle tick. *Vaccine*, 15: 414-422, 1997.
- CANALES, M.; LABRUNA, M. B.; SOARES, J. F.; PRUDENCIO, C. R. & DE LA FUENTE, J. Protective efficacy of bacterial membranes containing surface-exposed BM95 antigenic peptides for the control of cattle tick infestations. *Vaccine*, 27: 7244-7248, 2009b.
- CANALES, M.; NARANJO, V.; ALMAZAN, C.; MOLINA, R.; TSURUTA, S. A.; SZABO, M. P. J.; MANZANO-ROMAN, R.; DE LA LASTRA, J. M. P.; KOCAN, K. M.; JIMENEZ, M. I.; LUCIENTES, J.; VILLAR, M. & DE LA FUENTE, J. Conservation and immunogenicity of the mosquito ortholog of the tick-protective antigen, subolesin. *Parasitology Research*, 105: 97-111, 2009c.

CHAGAS, S.; FURLONG, J.; NASCIMENTO, C. B. Comportamento e ecologia de fêmeas ingurgitadas do carrapato *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens* no Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 38:4 188-191, 2001.

CHAO, L. L.; LIU, L. L.; HO, T. Y. & SHIH, C. M. First detection and molecular identification of *Borrelia garinii* spirochete from *Ixodes ovatus* tick ectoparasitized on stray cat in Taiwan. *Plos One*, 9: 2014.

CHEN, Z.; YANG, X. J.; BU, F. J.; YANG, X. H.; YANG, X. L. & LIU, J. Z. Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae, Ixodidae) of China. *Experimental and Applied Acarology*, 51: 393-404, 2010.

CHENG, X. W.; OBATA, K.; KUZUYA, M.; IZAWA, H.; NAKAMURA, K.; ASAI, E.; NAGASAKA, T.; SAKA, M.; KIMATA, T.; NODA, A.; NAGATA, K.; JIN, H.; SHI, G. P.; IGUCHI, A.; MUROHARA, T. & YOKOTA, M. Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure. *Hypertension*, 48: 979-987, 2006.

CHMELAR, J.; ANDERSON, J. M.; MU, J. B.; JOCHIM, R. C.; VALENZUELA, J. G. & KOPECKY, J. Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. *Bmc Genomics*, 9: 2008.

CORNWALL, G. A. & HSIA, N. A new subgroup of the family 2 cystatins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 200: 1-8, 2003.

DAI, J. F.; NARASIMHAN, S.; ZHANG, L. L.; LIU, L.; WANG, P. H. & FIKRIG, E. Tick Histamine Release Factor Is Critical for *Ixodes scapularis* Engorgement and Transmission of the Lyme Disease Agent. *Plos Pathogens*, 6: 2010.

DAI, J. F.; WANG, P. H.; ADUSUMILLI, S.; BOOTH, C. J.; NARASIMHAN, S.; ANGUITA, J. & FIKRIG, E. Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme Disease agent. *Cell Host & Microbe*, 6: 482-492, 2009.

DAVYDOVA, D. Y. & ZIGANGIROVA, N. A. *Chlamydia trachomatis* proteasome protein as a significant pathogenicity factor. *Molecular Genetics Microbiology and Virology*, 29: 47-52, 2014.

DE LA FUENTE, J.; ALMAZAN, C.; BLOUIN, E. F.; NARANJO, V. & KOCAN, K. M. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitology Research*, 96: 137-141, 2005.

DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; DE LA LASTRA, J.M.P.; KOCAN, K.M. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews*, 8:(1), 23, 2007

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M. & BLOUIN, E. F. Tick Vaccines and the transmission of tick-borne pathogens. *Veterinary Research Communications*, 31: 85-90, 2007.

DE LA FUENTE, J.; MANZANO-ROMAN, R.; NARANJO, V.; KOCAN, K. M.; ZIVKOVIC, Z.; BLOUIN, E. F.; CANALES, M.; ALMAZAN, C.; GALINDO, R. C.;

- STEP, D. L. & VILLAR, M. Identification of protective antigens by RNA interference for control of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Vaccine*, 28: 1786-1795, 2010.
- DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M. & GARCIA-GARCIA, J. C. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. *Tropical Veterinary Diseases*, 916: 617-621, 2000.
- 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 (TM). *Genetic Analysis-Biomolecular Engineering*, 15: 143-148, 1999.
- DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; GARCIA-GARCIA, J. C.; MENDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDES, M.; ENRIQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUE, O.; MACHADO, H.; LLEONART, R.; DE ARMAS, C. A.; REY, S.; RODRIGUEZ, J. L.; ARTILES, M. & GARCIA, L. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac (TM) against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine*, 16: 366-373, 1998.
- DE VOS, S.; ZEINSTRA, L.; TAOUFIK, A.; WILLADSEN, P. & JONGEJAN, F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Experimental and Applied Acarology*, 25: 245-261, 2001.
- DERUAZ, M.; FRAUENSCHUH, A.; ALESSANDRI, A. L.; DIAS, J. M.; COELHO, F. M.; RUSSO, R. C.; FERREIRA, B. R.; GRAHAM, G. J.; SHAW, J. P.; WELLS, T. N. C.; TEIXEIRA, M. M.; POWER, C. A. & PROUDFOOT, A. E. I. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *Journal of Experimental Medicine*, 205: 2019-2031, 2008.
- DHARAMPAUL, S.; KAUFMAN, W. R. & BELOSEVIC, M. Differential recognition of saliva antigens from the Ixodid tick *Amblyomma hebraeum* (Acari, Ixodidae) by sera from infested and immunized rabbits. *Journal of Medical Entomology*, 30: 262-266, 1993.
- DICKINSON, R. G.; OHAGAN, J. E.; SCHOTZ, M.; BINNINGTON, K. C. & HEGARTY, M. P. Prostaglandin in saliva of cattle tick *Boophilus microplus*. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 54: 475-486, 1976.
- DUBIN, G. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 653-669, 2005.
- EL-AWADY, M. K.; TABLL, A. A.; EL-ABD, Y. S.; YOUSIF, H.; HEGAB, M.; REDA, M.; EL SHENAWY, R.; MOUSTAFA, R. I.; DEGHEIDY, N. & EL DIN, N. G. B. Conserved peptides within the E2 region of Hepatitis C virus induce humoral and cellular responses in goats. *Virology Journal*, 6: 2009.
- EL-AWADY, M. K.; TABLL, A. A.; YOUSIF, H.; EL-ABD, Y.; REDA, M.; KHALIL, S. B.; EL-ZAYADI, A. R.; SHAKER, M. H. & EL DIN, N. G. B. Murine neutralizing antibody

response and toxicity to synthetic peptides derived from E1 and E2 proteins of hepatitis C virus. *Vaccine*, 28: 8338-8344, 2010.

ESTRADA-PENA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R. & WALKER, A. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Applied Acarology*, 38: 219-235, 2006.

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

FAGOTTO, F. Yolk Degradation in tick eggs .1. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 14: 217-235, 1990a.

FAGOTTO, F. Yolk Degradation in tick eggs .2. Evidence that cathepsins L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 14: 237-252, 1990b.

FAZA, A. P.; PINTO, I.S.B.; FONSECA, I.; ANTUNES, G. R.; MONTEIRO, C. M. D.; DAEMON, E.; MUNIZ, M. D.; MARTINS, M. F.; FURLONG, J. & PRATA, M. C. D. A new approach to characterization of the resistance of populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to organophosphate and pyrethroid in the state of Minas Gerais, Brazil. *Experimental Parasitology*, 134: 519-523, 2013.

FERREIRA, B. R. & SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64: 279-293, 1998.

FOUCAULT, M. L.; MOULES, V.; ROSA-CALATRAVA, M. & RITEAU, B. Role for proteases and HLA-G in the pathogenicity of influenza A viruses. *Journal of Clinical Virology*, 51: 155-159, 2011.

FRAGOSO, H.; RAD, P. H.; ORTIZ, M.; RODRIGUEZ, M.; REDONDO, M.; HERRERA, L. & DE LA FUENTE, J. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine*, 16: 1990-1992, 1998.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; MANS, B. J.; MENG, Z. J.; GUDDERRA, N.; VEENSTRA, T. D.; PHAM, V. M. & RIBEIRO, J. M. C. An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 1-21, 2008.

FRANTA, Z.; FRANTOVA, H.; KONVICKOVA, J.; HORN, M.; SOJKA, D.; MARES, M. & KOPACEK, P. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors*, 3: 2010.

FRANTA, Z.; SOJKA, D.; FRANTOVA, H.; DVORAK, J.; HORN, M.; SRBA, J.; TALACKO, P.; MARES, M.; SCHNEIDER, E.; CRAIK, C. S.; MCKERROW, J. H.;

- CAFFREY, C. R. & KOPACEK, P. IrCL1-The haemoglobinolytic cathepsin L of the hard tick, *Ixodes ricinus*. *International Journal for Parasitology*, 41: 1253-1262, 2011.
- FREES, D.; GERTH, U. & INGMER, H. Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 304: 142-149, 2014.
- FUKUOKA F.; KAWASAKI Y.; DEKIO S.; JIDOI J.; SUGIHARA K.; ABE K.; YAMANE Y. J. A case of tick-bite from *Ixodes ovatus* Neumann--a report from west Japan. *The Journal of Dermatology*, 16(1):76-8, 1989.
- GABRIEL, D.; ZULUAGA, M. F.; VAN DEN BERGH, H.; GURNY, R. & LANGE, N. It is all about proteases: from drug delivery to in vivo imaging and photomedicine. *Current Medicinal Chemistry*, 18: 1785-1805, 2011.
- GARCIA-GARCIA, J. C.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; VARGAS, M.; CANALES, M.; BOUE, O.; RODRIGUEZ, M.; JOGLAR, M.; MACHADO, H.; GONZALEZ, I. L.; 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*, 18: 2275-2287, 2000.
- GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R.; REIS, F. A.; AGUIRRE, A. R.; BARROS J. C.; MATIAS J. & KOLLER W. W. Contributions of the hair sheep breed Santa Ines as a maintenance host for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Parasites & Vectors* 7: 515, 2014.
- GEORGE, J. E.; POUND, J. M. & DAVEY, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129: S353-S366, 2004.
- GONSIOROSKI, A.V., BEZERRA, .IA., UTIUMI, K.U., DRIEMEIER, D., FARIAS, S.E., DA SILVA VAZ I. JR., MASUDA, A. Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females. *Experimental Parasitology*, 130: 359-63, 2012.
- GONZALES, J. C. O controle do carrapato do boi. 2ed. Porto Alegre, 2003
- GRAF, J. F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G. A.; MOLENTO, M. B.; BORDIN, E. L. & ARANTES, G. J. Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, 129: S427-S442, 2004.
- GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.D.; DE BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANCADO, P.H.D.; DE LEON, A.A.P.; PEREIRA, J.B. & VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 23: 150-156, 2014.
- GRUBB, A. O.; WEIBER, H. & LOFBERG, H. The Gamma-Trace Concentration of Normal Human Seminal Plasma Is 36 Times That of Normal Human-Blood Plasma. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 43: 421-425, 1983.

GRUNCLOVA, L.; HORN, M.; VANCOVA, M.; SOJKA, D.; FRANTA, Z.; MARES, M. & KOPACEK, P. Two secreted cystatins of the soft tick *Ornithodoros moubata*: differential expression pattern and inhibitory specificity. *Biological Chemistry*, 387: 1635-1644, 2006.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS R. G.; APANASKEVICH D. A.; PETNEY N. T.; ESTRADA-PEÑA A.; HORAK I. G. The hard ticks of the world (Acari: Ixodida: Ixodidae), 2014.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PENA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R. F. & BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 1-28, 2010.

HAFEZ, Y. S. & MOHAMED, A. I. Presence of Non-Protein Trypsin-Inhibitor in Soy and Winged Beans. *Journal of Food Science*, 48: 75-76, 1983.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41: 95-98, 1999.

HORN, F.; DOS SANTOS, P. C. & TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: An antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384: 68-73, 2000.

HORN, M.; NUSSBAUMEROVA, M.; SANDA, M.; KOVAROVA, Z.; SRBA, J.; FRANTA, Z.; SOJKA, D.; BOGYO, M.; CAFFREY, C. R.; KOPACEK, P. & MARES, M. hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chemistry & Biology*, 16: 1053-1063, 2009.

HOVIUS, J. W. R.; DE JONG, M. A. W. P.; DEN DUNNEN, J.; LITJENS, M.; FIKRIG, E.; VAN DER POLL, T.; GRINGHUIS, S. I. & GEIJTENBEEK, T. B. H. Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *Plos Pathogens*, 4: 2008.

HSING, L. C. & RUDENSKY, A. Y. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunological Reviews*, 207: 229-241, 2005.

IMAMURA, S.; KONNAI, S.; YAMADA, S.; PARIZI, L. F.; GITHAKA, N.; VAZ, I. D.; MURATA, S. & OHASHI, K. Identification and partial characterization of a gut *Rhipicephalus appendiculatus* cystatin. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4: 138-144, 2013.

JAMES, M.N.G. Catalytic pathway of aspartic peptidases. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2 ed., p.12-19, 2004

JAMESON, B. A. & WOLF, H. The antigenic index - a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Computer Applications in the Biosciences*, 4: 181-186, 1988.

JEYABAL, L.; AZHAHIANAMBI, P.; SUSITHA, K.; RAY, D. D.; CHAUDHURI, P.; VANLAHMUAKA & GHOSH, S. Efficacy of rHaa86, an Orthologue of Bm86, Against Challenge Infestations of *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57: 96-102, 2010.

JONSSON, N. N.; PIPER, E. K. & CONSTANTINOIU, C. C. Host resistance in cattle to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Parasite Immunology*, 36: 551-557, 2014.

JOYCE, J. A.; BARUCH, A.; CHEHADE, K.; MEYER-MORSE, N.; GIRAUDO, E.; TSAI, F. Y.; GREENBAUM, D. C.; HAGER, J. H.; BOGYO, M. & HANAHAN, D. Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell*, 5: 443-453, 2004.

JUNCADELLA, I. J.; GARG, R.; ANANTHNARAYANAN, S. K.; YENGO, C. M. & ANGUITA, J. T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 49: 433-438, 2007.

KARIM, S. & ADAMSON, S. W. RNA Interference in Ticks: A Functional Genomics Tool for the Study of Physiology. *Small Rnas: Their Diversity, Roles and Practical Uses*, 42: 119-154, 2012.

KARIM, S.; MILLER, N. J.; VALENZUELA, J.; SAUER, J. R. & MATHER, T. N. RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334: 1336-1342, 2005.

KASHINO, S. S.; RESENDE, J.; SACCO, A. M. S.; ROCHA, C.; PROENCA, L.; CARVALHO, W. A.; FIRMINO, A. A.; QUEIROZ, R.; BENAVIDES, M.; GERSHWIN, L. J. & SANTOS, I. K. F. D. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Experimental Parasitology*, 110: 12-21, 2005.

KASHPAROV, I. V.; POPOV, M. E.; RUMSH, L. D. & POPOV, E. M. Mechanism of action of aspartic proteases. V. Conformational characteristics of fragments of substrate-binding sites in rhizopuspepsin and HIV-1 protease. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 25: 597-602, 1999.

KAWAHARA, M.; RIKIHISA, Y.; ISOGAI, E.; TAKAHASHI, M.; MISUMI, H.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; ZHANG, C. B. & TSUJI, M. Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1837-1843, 2004.

KLEMENCIC, I.; CARMONA, A. K.; CEZARI, M. H. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; GUNCAR, G.; TURK, D.; KRIZAJ, I.; TURK, V. & TURK, B. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *European Journal of Biochemistry*, 267: 5404-5412, 2000.

KOBLINSKI, J. E.; AHRAM, M. & SLOANE, B. F. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clinica Chimica Acta*, 291: 113-135, 2000.

- KOŁODZIEJCZYK, R.; MICHALSKA, K.; HERNANDEZ-SANTOYO, A.; WAHLBOM, M.; GRUBB, A. & JASKOLSKI, M. Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *Febs Journal*, 277: 1726-1737, 2010.
- KONNAI, S.; NAKAJIMA, C.; IMAMURA, S.; YAMADA, S.; NISHIKADO, H.; KODAMA, M.; ONUMA, M. & OHASHI, K. Suppression of cell proliferation and cytokine expression by HL-p36, a tick salivary gland-derived protein of *Haemaphysalis longicornis*. *Immunology*, 126: 209-219, 2009.
- KOTSYFAKIS, M.; ANDERSON, J. M.; ANDERSEN, J. F.; CALVO, E.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; VALENZUELA, J. G. & RIBEIRO, J. M. C. Cutting edge: Immunity against a "Silent" salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *Journal of Immunology*, 181: 5209-5212, 2008.
- KOTSYFAKIS, M.; KARIM, S.; ANDERSEN, J. F.; MATHER, T. N. & RIBEIRO, J. M. C. Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 29256-29263, 2007.
- KOTSYFAKIS, M.; SA-NUNES, A.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; ANDERSEN, J. F. & RIBEIRO, J. M. C. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 26298-26307, 2006.
- LABRUNA, M. B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A. J.; THOMPSON, C.; ESTRADA-PENA, A.; GUGLIELMONE, A. A.; JONGEJAN, F. & DE LA FUENTE, J. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Bmc Evolutionary Biology*, 9: 2009.
- LASKOWSKI, M. & KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 593-626, 1980.
- LAWRENCE, L. J. & CASIDA, J. E. Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the gamma-aminobutyric acid receptor ionophore complex. *Science*, 221: 1399-1401, 1983.
- LEE, S. E.; KIM, J. M.; JEONG, S. K.; JEON, J. E.; YOON, H. J.; JEONG, M. K. & LEE, S. H. Protease-activated receptor-2 mediates the expression of inflammatory cytokines, antimicrobial peptides, and matrix metalloproteinases in keratinocytes in response to *Propionibacterium acnes*. *Archives of Dermatological Research*, 302: 745-756, 2010.
- LIESKOVSKÁ, J.; PÁLENÍKOVÁ, J.; ŠIRMAROVÁ, J.; ELSTEROVÁ, J.; KOTSYFAKIS, M.; CAMPOS CHAGAS, A.; CALVO, E.; RŮŽEK, D.; KOPECKÝ, J. Tick salivary cystatin sialostatin L2 suppresses IFN responses in mouse dendritic cells. *Parasite Immunology*, 37(2):70-8, 2015.
- LIU, X. Y.; DE LA FUENTE, J.; COTE, M.; GALINDO, R. C.; MOUTAILLER, S.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. & BONNET, S. I. IrSPI, a tick serine protease inhibitor involved in tick feeding and *Bartonella henselae* infection. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 8: 2014.

LOPEZ-OTIN, C. & BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 30433-30437, 2008.

LU, S.; SOARES, T. S.; VAZ, I. S.; LOVATO, D. V. & TANAKA, A. S. Rmcystatin3, a cysteine protease inhibitor from *Rhipicephalus microplus* hemocytes involved in immune response. *Biochimie*, 106C: 17-23, 2014.

LUBECK, I.; ARRUDA, W.; SOUZA, B. K.; STANISCUASKI, F.; CARLINI, C. R.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecology*, 1: 78-88, 2008.

LYO, V.; CATTARUZZA, F.; KIM, T. N.; WALKER, A. W.; PAULICK, M.; COX, D.; CLOYD, J.; BUXBAUM, J.; OSTROFF, J.; BOGYO, M.; GRADY, E. F.; BUNNETT, N. W. & KIRKWOOD, K. S. Active cathepsins B, L, and S in murine and human pancreatitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303: G894-G903, 2012.

MANZANO-ROMÁN R.; DÍAZ-MARTÍN V.; OLEAGA A.; SILES-LUCAS M.; PÉREZ-SÁNCHEZ R. Subolesin/akirin orthologs from *Ornithodoros* spp. soft ticks: cloning, RNAi gene silencing and protective effect of the recombinant protein. *Veterinary Parasitology*, 185: 248–259, 2012.

MANZANO-ROMÁN, R.; DÍAZ-MARTÍN, V.; OLEAGA, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. Identification of protective linear B-cell epitopes on the subolesin/akirin orthologues of *Ornithodoros* spp. soft ticks. *Vaccine (in press)*, 2015

MERINO, O.; ALBERDI, P.; DE LA LASTRA, J. M. P. & DE LA FUENTE, J. Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3: 2013.

MIYAMOTO, K. & NAKAO, M. Frequent occurrence of human tick bites and monthly fluctuation of ixodid ticks in Hokkaido, Japan. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*. 42: 267-269, 1991.

MORRISON, J.F. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 5: 269-286, 1969.

MULENGA, A.; SUGIMOTO, C. & ONUMA, M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infection*, 2: 1353-1361, 2000.

MURRELL, A. & BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56: 169-172, 2003.

NAKAGAWA, T.; ROTH, W.; WONG, P.; NELSON, A.; FARR, A.; DEUSSING, J.; VILLADANGOS, J. A.; PLOEGH, H.; PETERS, C. & RUDENSKY, A. Y. Cathepsin L: Critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science*, 280: 450-453, 1998.

NI, J.; ABRAHAMSON, M.; ZHANG, M.; FERNANDEZ, M. A.; GRUBB, A.; SU, J.; YU, G. L.; LI, Y. L.; PARMELEE, D.; XING, L.; COLEMAN, T. A.; GENTZ, S.; THOTAKURA, R.; NGUYEN, N.; HESSELBERG, M. & GENTZ, R. Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 10853-10858, 1997.

NISHIMURA, K. The mode of action of pyrethroids. *Journal of Pesticide Science*, 9: 365-374, 1984.

OCHIENG, J. & CHAUDHURI, G. Cystatin superfamily. *Journal of Health Care for the Poor and Underserved*, 21: 51-70, 2010.

OLDZIEJ, S. & CIARKOWSKI, J. Mechanism of action of aspartic proteinases: Application of transition-state analogue theory. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 10: 583-588, 1996.

OTTO, H. H. & SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chemical Reviews*, 97: 133-171, 1997.

OVERALL, C. M. & LOPEZ-OTIN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. *Nature Reviews Cancer*, 2: 657-672, 2002.

PARIZI, L. F.; GITHAKA, N. W.; LOGULLO, C.; KONNAI, S.; MASUDA, A.; OHASHI, K. & VAZ, I. D. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. *Veterinary Journal*, 194: 158-165, 2012.

PARIZI, L. F.; RECH, H.; FERREIRA, C. A. S.; IMAMURA, S.; OHASHI, K.; ONUMA, M.; MASUDA, A. & VAZ, I. D. Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* calreticulins. *Veterinary Parasitology*, 164: 282-290, 2009.

PARIZI, L. F.; SABADIN, G. A.; ALZUGARAY, M. F.; SEIXAS, A.; LOGULLO, C.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ JR, I. *Rhipicephalus microplus* and *Ixodes ovatus* cystatins in tick blood digestion and evasion of host immune response. *Parasites and Vectors* (no prelo)

PARIZI, L. F.; UTIUMI, K. U.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; OHASHI, K.; MASUDA, A. & VAZ, I. D. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Experimental Parasitology*, 127: 113-118, 2011.

PATARROYO, J. H.; PORTELA, R. W.; DE CASTRO, R. O.; PIMENTEL, J. C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; VARGAS, M. I.; PRATES, A. A. & MENDES, M. A. D. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88: 163-172, 2002.

PETCHAMPAL, N.; SUNYAKUMTHORN, P.; GUILLOTTE, M. L.; VERHOEVE, V. I.; BANAJEE, K. H.; KEARNEY, M. T. & MACALUSO, K. R. Novel identification of *Dermacentor variabilis* Arp2/3 complex and its role in rickettsial infection of the arthropod vector. *Plos One*, 9: 2014.

- PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. & NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8: 785-786, 2011.
- PHAM, C. T. N. & LEY, T. J. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 8627-8632, 1999.
- POPARA, M.; VILLAR, M.; MATEOS-HERNANDEZ, L.; DE MERA, I. G. F. & DE LA FUENTE, J. Proteomics approach to the study of cattle tick adaptation to white tailed deer. *Biomed Research International*, 2013.
- POWERS, J. C. Transition-state and mechanism-based inhibitors for cysteine proteases. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 209: 240-MEDI, 1995.
- PRUDENCIO, C. R.; DE LA LASTRA, J. M. P.; CANALES, M.; VILLAR, M. & DE LA FUENTE, J. Mapping protective epitopes in the tick and mosquito subolesin ortholog proteins. *Vaccine*, 28: 5398-5406, 2010.
- PUENTE, X. S. & LOPEZ-OTIN, C. A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome Research*, 14: 609-622, 2004.
- PUENTE, X. S.; SANCHEZ, L. M.; GUTIERREZ-FERNANDEZ, A.; VELASCO, G. & LOPEZ-OTIN, C. A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochemical Society Transactions*, 33: 331-334, 2005.
- RAMAMOORTHI, N.; NARASIMHAN, S.; PAL, U.; BAO, F. K.; YANG, X. F. F.; FISH, D.; ANGUITA, J.; NORGDARD, M. V.; KANTOR, F. S.; ANDERSON, J. F.; KOSKI, R. A. & FIKRIG, E. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, 436: 573-577, 2005.
- RAWLINGS, N. D. Peptidase inhibitors in the MEROPS database. *Biochimie*, 92: 1463-1483, 2010.
- RAWLINGS, N. D. & BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290: 205-218, 1993.
- RAWLINGS, N. D. & MORTON, F. R. The MEROPS batch BLAST: A tool to detect peptidases and their non-peptidase homologues in a genome. *Biochimie*, 90: 243-259, 2008.
- RAWLINGS, N.D., WALLER, M., BARRETT, A.J. & BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* **42**, 503-509, 2014.
- RECK, J.; BERGER, M.; MARKS, F. S.; ZINGALI, R. B.; CANAL, C. W.; FERREIRA, C. A. S.; GUIMARAES, J. A. & TERMIGNONI, C. Pharmacological action of tick saliva upon haemostasis and the neutralization ability of sera from repeatedly infested hosts. *Parasitology*, 136: 1339-1349, 2009.

- RENARD, G.; GARCIA, J. F.; CARDOSO, F. C.; RICHTER, M. F.; SAKANARI, J. A.; OZAKI, L. S.; TERMIGNONI, C. & MASUDA, A. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1017-1026, 2000.
- RIBEIRO, J. M. C.; ALARCON-CHAIDEZ, F.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; MANS, B. J.; MATHER, T. N.; VALENZUELA, J. G. & WIKEL, S. K. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 111-129, 2006.
- RIBEIRO, J. M. C.; ANDERSON, J. M.; MANOUKIS, N. C.; MENG, Z. J. & FRANCISCHETTI, I. M. B. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *Bmc Genomics*, 12: 2011.
- RIEDL, S. J. & SALVESEN, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 405-413, 2007.
- ROBERTS, J. A. & KERR, J. D. *Boophilus microplus* - passive transfer of resistance in cattle. *Journal of Parasitology*, 62: 485-489, 1976.
- RODRIGUEZ, M.; MASSARD, C. L.; DAFONSECA, A. H.; RAMOS, N. F.; MACHADO, H.; LABARTA, V. & DELAFUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross bred cattle in Brazil. *Vaccine*, 13: 1804-1808, 1995.
- ROSARIO-CRUZ, R.; ALMAZAN, C.; MILLER, R.J.; DOMINGUEZ-GARCIA, D.I.; HERNANDEZ-ORTIZ, R. & DE LA FUENTE, J. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Frontiers in Bioscience*, 14: 2657-2665, 2009.
- RUDENSKAYA, G. N. & PUPOV, D. V. Cysteine proteinases of microorganisms and viruses. *Biochemistry-Moscow*, 73: 1-13, 2008.
- SAITO-ITO, A.; YANO, Y.; DANTRAKOOL, A.; HASHIMOTO, T. & TAKADA, N. Survey of rodents and ticks in human babesiosis emergence area in Japan: First detection of *Babesia microti*-like parasites in *Ixodes ovatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 2268-2270, 2004.
- SALAT, J.; PAESEN, G. C.; REZACOVA, P.; KOTSYFAKIS, M.; KOVAROVA, Z.; SANDA, M.; MAJTAN, J.; GRUNCLOVA, L.; HORKA, H.; ANDERSEN, J. F.; BRYNDA, J.; HORN, M.; NUNN, M. A.; KOPACEK, P.; KOPECKY, J. & MARES, M. Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Biochemical Journal*, 429: 103-112, 2010.
- SALVESEN, G.; PARKES, C.; ABRAHAMSON, M.; GRUBB, A. & BARRETT, A. J. Human low-mr kininogen contains 3 copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochemical Journal*, 234: 429-434, 1986.
- SA-NUNES, A.; BAFICA, A.; ANTONELLI, L. R.; CHOI, E. Y.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; ANDERSEN, J. F.; SHI, G. P.; CHAVAKIS, T.; RIBEIRO, J. M. & KOTSYFAKIS, M.

The immunomodulatory action of sialostatin I on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. *Journal of Immunology*, 182: 7422-7429, 2009.

SCHLEGER, A. V.; LINCOLN, D. T.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H. & ROBERTS, J. A. *Boophilus microplus* - cellular responses to larval attachment and their relationship to host-resistance. *Australian Journal of Biological Sciences*, 29: 499-512, 1976.

SCHUIJT, T. J.; COUMOU, J.; NARASIMHAN, S.; DAI, J. F.; DEPONTE, K.; WOUTERS, D.; BROUWER, M.; OEI, A.; ROELOFS, J. J. T. H.; VAN DAM, A. P.; VAN DER POLL, T.; VAN'T VEER, C.; HOVIUS, J. W. & FIKRIG, E. A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the Lyme Disease agent. *Cell Host & Microbe*, 10: 136-146, 2011a.

SCHUIJT, T. J.; HOVIUS, J. W. R.; VAN BURGEL, N. D.; RAMAMOORTHY, N.; FIKRIG, E. & VAN DAM, A. P. The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infection and Immunity*, 76: 2888-2894, 2008.

SCHUIJT, T. J.; NARASIMHAN, S.; DAFFRE, S.; DEPONTE, K.; HOVIUS, J. W. R.; VAN'T VEER, C.; VAN DER POLL, T.; BAKHTIARI, K.; MEIJERS, J. C. M.; BODER, E. T.; VAN DAM, A. P. & FIKRIG, E. Identification and characterization of *Ixodes scapularis* antigens that elicit tick immunity using yeast surface display. *Plos One*, 6: 2011b.

SCHWARZ, A.; VALDES, J. J. & KOTSYFAKIS, M. The role of cystatins in tick physiology and blood feeding. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3: 117-127, 2012.

SEIFERT, G. W.; SPRINGEL, P. H. & TATCHELL, R. J. Radioactive studies on feeding of larvae nymphs and adults of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*, 58: 415-424, 1968.

SEIXAS, A.; DOS SANTOS, P. C.; VELLOSO, F. F.; VAZ, I. D.; MASUDA, A.; HORN, F. & TERMIGNONI, C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, 126: 155-163, 2003.

SEIXAS, A.; ESTRELA, A. B.; CEOLATO, J. C.; PONTES, E. G.; LARA, F.; GONDIM, K. C. & TERMIGNONI, C. Localization and function of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, 137: 1819-1831, 2010.

SHAH, P. K.; TRIPATHI, L. P.; JENSEN, L. J.; GAHNIM, M.; MASON, C.; FURLONG, E. E.; RODRIGUES, V.; WHITE, K. P.; BORK, P. & SOWDHAMINI, R. Enhanced function annotations for *Drosophila* serine proteases: A case study for systematic annotation of multi-member gene families. *Gene*, 407: 199-215, 2008.

SHI, G. P.; BRYANT, R. A. R.; RIESE, R.; VERHELST, S.; DRIESSEN, C.; LI, Z. Q.; BROMME, D.; PLOEGH, H. L. & CHAPMAN, H. A. Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 191: 1177-1185, 2000.

SHI, G. P.; VILLADANGOS, J. A.; DRANOFF, G.; SMALL, C.; GU, L. J.; HALEY, K. J.; RIESE, R.; PLOEGH, H. L. & CHAPMAN, H. A. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*, 10: 197-206, 1999.

SHIBATA, S.; KAWAHARA, M.; RIKIHISA, Y.; FUJITA, H.; WATANABE, Y.; SUTO, C. & ITO, T. New *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1331-1338, 2000.

SHOOP, W. L.; MROZIK, H. & FISHER, M. H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, 59: 139-156, 1995.

SIRIMA, S. B.; TIONO, A. B.; OUEDRAOGO, A.; DIARRA, A.; OUEDRAOGO, A. L.; YARO, J. B.; OUEDRAOGO, E.; GANSANE, A.; BOUGOUMA, E. C.; KONATE, A. T.; KABORE, Y.; TRAORE, A.; ROMA, C.; SOULAMA, I.; LUTY, A. J. F.; COUSENS, S. & NEBIE, I. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate msp3 long synthetic peptide in 12-24 months-old Burkinabe children. *Plos One*, 4: 2009.

SKALLOVA, A.; IEZZI, G.; AMPENBERGER, F.; KOPF, M. & KOPECKY, J. Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *Journal of Immunology*, 180: 6186-6192, 2008.

SOJKA, D.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; CALVO, E. & KOTSYFAKIS, M. Cysteine proteases from bloodfeeding arthropod ectoparasites. *Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms*, 712: 177-191, 2011.

SOJKA, D.; FRANTA, Z.; HORN, M.; CAFFREY, C. R.; MARES, M. & KOPACEK, P. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends in Parasitology*, 29: 276-285, 2013.

SOJKA, D.; FRANTA, Z.; HORN, M.; HAJDUSEK, O.; CAFFREY, C. R.; 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. *Parasites & Vectors*, 1: 2008.

SONENSHINE, D. E. Biology of ticks. Oxford, UK, *Oxford University Press*, 2^a ed. 2013

SOUTHAN, C. Assessing the protease and protease inhibitor content of the human genome. *Journal of Peptide Science*, 6: 453-458, 2000.

SUTHERST, R. W.; MAYWALD, G. F.; KERR, J. D. & STEGEMAN, D. A. The effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos-indicus* X *Bos-taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34: 317-327, 1983.

TAKEDA, T.; ITO, T.; CHIBA, M.; TAKAHASHI, K.; NIIOKA, T. & TAKASHIMA, I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes ovatus* (Acari : Ixodidae) in Japan. *Journal of Medical Entomology*, 35: 227-231, 1998.

TANG, H.; LIU, X.; FANG, Y.; JIANG, S.; PAN, L.; LV, J.; ZHANG, Z.; ZHOU, P.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; WEI SHENG WU XUE BAO. Evaluation of synthetic peptide vaccines against foot-and-mouth disease type A. (6): 596-607, 2013

TAVASSOLI, M.; POURSEYED, S. H.; OWNAGH, A.; BERNOUSI, I. & MARDANI, K. Biocontrol of pigeon tick argas reflexus (Acari: Argasidae) by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 1445-1452, 2011.

TEPEL, C.; BROMME, D.; HERZOG, V. & BRIX, K. Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *Journal of Cell Science*, 113: 4487-4498, 2000.

TIRLONI, L.; RECK, J.; TERRA, R. M. S.; MARTINS, J. R.; MULENGA, A.; SHERMAN, N. E.; FOX, J. W.; YATES, J. R.; TERMIGNONI, C.; PINTO, A. F. M. & VAZ, I. D. Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: A comparison between partially and fully engorged females. *Plos One*, 9: 2014.

TRIMNELL, A. R.; DAVIES, G. M.; LISSINA, O.; HAILS, R. S. & NUTTALL, P. A. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*, 23: 4329-4341, 2005.

TURK, B.; TURK, D. & SALVESEN, G. S. Regulating cysteine protease activity: Essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 1623-1637, 2002.

TURK, B.; TURK, D. & TURK, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477: 98-111, 2000.

TURK, V. & BODE, W. The cystatins - protein inhibitors of cysteine proteinases. *Febs Letters*, 285: 213-219, 1991.

TURK, V.; TURK, B. & TURK, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *Embo Journal*, 20: 4629-4633, 2001.

UETI, M. W.; PALMER, G. H.; KAPPMAYER, L. S.; SCOLES, G. A. & KNOWLES, D. P. Expression of equi merozoite antigen 2 during development of *Babesia equi* in the midgut and salivary gland of the vector tick *Boophilus microplus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 5803-5809, 2003.

VALENZUELA, J. G.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; PHAM, V. M.; GARFIELD, M. K.; MATHER, T. N. & RIBEIRO, J. M. C. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Experimental Biology*, 205: 2843-2864, 2002.

VAN DER HOORN, R. A. L. Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 191-223, 2008.

VAN POELGEEST, M. I. E.; WELTERS, M. J. P.; VAN ESCH, E. M. G.; STYNENBOSCH, L. F. M.; KERPERSHOEK, G.; VAN MEERTEN, E. L. V.; VAN DEN HENDE, M.; LOWIK, M. J. G.; BERENDS-VAN DER MEER, D. M. A.; FATHERS, L. M.; VALENTIEN, A. R. P. M.; OOSTENDORP, J.; FLEUREN, G. J.; MELIEF, C. J. M.; KENTER, G. G. & VAN DER BURG, S. H. HPV16 synthetic long peptide (HPV16-SLP)

- vaccination therapy of patients with advanced or recurrent HPV16-induced gynecological carcinoma, a phase II trial. *Journal of Translational Medicine*, 11: 2013.
- WELBOURN, S. & PAUSE, A. The hepatitis C virus NS2/3 protease. *Current Issues in Molecular Biology*, 9: 63-69, 2007.
- WIKEL, S. K. Tick modulation of host cytokines. *Experimental Parasitology*, 84: 304-309, 1996.
- WIKEL, S. K. & ALLEN, J. R. Acquired-resistance to Ticks .1. Passive Transfer of Resistance. *Immunology*, 30: 311-316, 1976.
- WIKEL, S. K. & BERGMAN, D. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*, 13: 383-389, 1997.
- WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G. S. & HUNGERFORD, J. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 110: S43-S50, 1995.
- YAMAJI, K.; TSUJI, N.; MIYOSHI, T.; ISLAM, M. K.; HATTA, T.; ALIM, M. A.; ANISUZZAMAN; TAKENAKA, A. & FUJISAKI, K. Hemoglobinase activity of a cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitology International*, 58: 232-237, 2009a.
- YAMAJI, K.; TSUJI, N.; MIYOSHI, T.; ISLAM, M. K.; HATTA, T.; ALIM, M. A.; ANISUZZAMAN, M.; KUSHIBIKI, S. & FUJISAKI, K. A salivary cystatin, HISC-1, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* play roles in the blood-feeding processes. *Parasitology Research*, 106: 61-68, 2009b.
- YANO, Y.; SAITO-ITO, A.; ANCHALEE, D. & TAKADA, N. Japanese *Babesia microti* cytologically detected in salivary glands of naturally infected tick *Ixodes ovatus*. *Microbiology and Immunology*, 49: 891-897, 2005.
- YANO, Y.; TAKADA, N. & ISHIGURO, F. Location and ultrastructure of *Borrelia japonica* in naturally infected *Ixodes ovatus* and small mammals. *Microbiology and Immunology*, 41: 13-19, 1997.
- ZAMOTO-NIIKURA, A.; TSUJI, M.; QIANG, W.; NAKAO, M.; HIRATA, H. & ISHIHARA, C. Detection of two zoonotic *Babesia microti* lineages, the Hobetsu and U.S. lineages, in two sympatric tick species, *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus*, respectively, in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 3424-3430, 2012.
- ZHOU, J. L.; LIAO, M.; GONG, H. Y.; XUAN, X. N. & FUJISAKI, K. Characterization of Hlcyst-3 as a member of cystatins from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Experimental and Applied Acarology*, 51: 327-333, 2010.
- ZHOU, J. L.; UEDA, M.; UMEMIYA, R.; BATTSETSEG, B.; BOLDBAATAR, D.; XUAN, X. A. & FUJISAKI, K. A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 527-535, 2006.

ZIVKOVIC, Z.; ESTEVES, E.; ALMAZAN, C.; DAFFRE, S.; NIJHOF, A. M.; KOCAN, K. M.; JONGEJAN, F. & DE LA FUENTE, J. Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale*. *Bmc Genomics*, 11: 2010.

7. APÊNDICES

Cópia da carta do editor do periódico confirmando submissão do artigo:

Assunto: Article processing charge for manuscript submitted to Parasites & Vectors

Data: Wed, 17 Dec 2014 16:52:48 -0200 (BRST)

De: BioMed Central Accounts <payment@biomedcentral.com>

Para: itabajara.vaz@ufrgs.br

MS: 2076710263153947

Rhipicephalus microplus and *Ixodes ovatus* cystatins in tick blood digestion and evasion of host immune response

Luís Fernando Parizi, Gabriela A Sabadin, María Fernanda Alzugaray, Adriana Seixas, Carlos Logullo, Satoru Konnai, Kazuhiko Ohashi, Aoi Masuda and itabajara da Silva Vaz Jr
Parasites & Vectors

Dear Dr. vaz

Thank you for agreeing the article processing charge for Parasites & Vectors. I would like to update you regarding your status with respect to the article processing charge that is normally due if a manuscript is accepted.

You have agreed to pay an article processing charge of GBP 1,205.00/USD 2,050.00/EUR 1,525.00 if your manuscript is accepted.

Since you are based in Brazil, you will be charged the price of GBP 1,205.00.

Submissions from EU countries are subject to VAT at 20.0%. (Please note from 1 January 2015 this rate will change to the rate applicable in your country. Read more here http://ec.europa.eu/taxation_customs/taxation/vat/how_vat_works/telecom/index_en.htm#new_rules.)

Payment will become due if your manuscript is accepted for publication by the editors. We allow payment by credit card or invoice. Invoice payments are subject to an administrative charge of GBP 50.00/EUR 55.00/USD 75.00. Payments via the online credit card system will also produce an invoice/receipt that can be used for your records and will avoid the GBP 50 administration fee. The article processing charge must be paid before the manuscript will be published.

Kind regards,

BioMed Central Accounts Team

236 Gray's Inn Road

London

WC1X 8HB

Tel: +44 (0) 20 3192 2009

e-mail: payment@biomedcentral.com

Parasites & Vectors

Rhipicephalus microplus and Ixodes ovatus cystatins in tick blood digestion and evasion of host immune response

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PARV-D-14-00232R2
Full Title:	Rhipicephalus microplus and Ixodes ovatus cystatins in tick blood digestion and evasion of host immune response
Article Type:	Research
Abstract:	<p>Background: Cystatins are a group of cysteine protease inhibitors responsible for physiological proteolysis regulation and present in a wide range of organisms. Studies about this class of inhibitors in parasites have contributed to clarify their roles in important physiological processes, like blood digestion and modulation of host immune response during blood feeding. Thus, cystatins are a subject of research on the development of new parasite control methods. Additionally, the characterization of proteins shared by different parasite species represents a valuable strategy to find potential targets in multi-species control methods. However, cystatin functions in ticks remain undetermined, especially in Rhipicephalus microplus and Ixodes ovatus, two species that affect livestock and human health, respectively.</p> <p>Methods: Here we report the inhibitory profile of two R. microplus (BrBmcys2b and BrBmcys2c) and one I. ovatus (Jplocys2a) cystatins to commercial cathepsins B, C, and L. The presence of native cystatins in R. microplus tissues was analyzed using sera against recombinant BrBmcys2b and BrBmcys2c. Also, a peptide from Jplocys2a was synthesized for rabbit immunization, and this serum was used to analyze the cross antigenicity between R. microplus and I. ovatus cystatins.</p> <p>Results: Enzymatic inhibition profile of tick cystatins shows a distinct modulation for cathepsins related to tick blood digestion and evasion of host immune response. Furthermore, BrBmcys2b was detected in saliva and different tissues along tick stages, while BrBmcys2c was detected mainly in gut from partially engorged R. microplus females, demonstrating a distinct pattern of cystatin expression, secretion and traffic between tick tissues. Moreover, phylogenetic analysis suggests that Jplocys2a belongs to the group of tick gut secreted cystatins. Finally, cross-antigenicity assays revealed that antibodies against the Jplocys2a peptide recognize native and recombinant R. microplus cystatins.</p> <p>Conclusion: The presence of these proteins in different tissues and their ability to differentially inhibit cathepsins suggest distinct roles for Jplocys2a, BrBmcys2b, and BrBmcys2c in blood digestion, egg and larvae development, and modulation of host immune response in tick physiology. The cross-antigenicity between native and recombinant cystatins supports further experiments using Jplocys2a, BrBmcys2b, and BrBmcys2c as vaccine antigens.</p>
Corresponding Author:	itabajara da Silva Vaz Jr, PhD Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Luís Fernando Parizi, PhD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Luís Fernando Parizi, PhD Gabriela A Sabadin, Master María Fernanda Alzugaray, Master Adriana Seixas, PhD

	Carlos Logullo, PhD
	Satoru Konnai, PhD
	Kazuhiko Ohashi, PhD
	Aoi Masuda, PhD
	itabajara da Silva Vaz Jr, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Response to Reviewers:	

1 1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

2 ***Rhipicephalus microplus* and *Ixodes ovatus* cystatins in tick blood digestion and**
3 **evasion of host immune response**

4 Luís Fernando Parizi ^{a#}, Gabriela Alves Sabadin ^{a#}, María Fernanda Alzugaray ^{a,c}, Adriana
5 Seixas ^{a,d,g}, Carlos Logullo ^{e,g}, Satoru Konnai ^b, Kazuhiko Ohashi ^b, Aoi Masuda ^{a,g},
6 Itabajara da Silva Vaz Jr ^{a,f,g*}

7
8 ^a *Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento*
9 *Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil.*

10
11 ^b *Laboratory of Infectious Diseases, Department of Disease Control, Graduate School of*
12 *Veterinary Medicine, Hokkaido University, 060-0818, Sapporo, Hokkaido, Japan.*

13
14 ^c *Laboratorio de Inmunología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de*
15 *Veterinaria, UDELAR, Montevideo, Uruguay.*

16
17 ^d *Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de*
18 *Porto Alegre, Rua Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.*

19
20 ^e *Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos–CBB–UENF and Unidade*
21 *de Experimentação Animal, Avenida Alberto Lamego, 2000, Horto, Campos dos*
22 *Goytacazes, CEP 28015-620, RJ, Brazil.*

23
24 ^f *Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento*
25 *Gonçalves, 9090, Porto Alegre 91540-000, RS, Brazil.*

26
27 ^g *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular.*

28 # Equal contributors.

29
30 * Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 6078.

31 *E-mail address: itabajara.vaz@ufrgs.br (I. da Silva Vaz Jr).*

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

40 **Abstract**

1 41 **Background:** Cystatins are a group of cysteine protease inhibitors responsible for
2
3 42 physiological proteolysis regulation and present in a wide range of organisms. Studies
4
5 43 about this class of inhibitors in parasites have contributed to clarify their roles in important
6
7 44 physiological processes, like blood digestion and modulation of host immune response
8
9 45 during blood feeding. Thus, cystatins are a subject of research on the development of new
10
11 46 parasite control methods. Additionally, the characterization of proteins shared by different
12
13 47 parasite species represents a valuable strategy to find potential targets in multi-species
14
15 48 control methods. However, cystatin functions in ticks remain undetermined, especially in
16
17 49 *Rhipicephalus microplus* and *Ixodes ovatus*, two species that affect livestock and human
18
19 50 health, respectively.

20 51 **Methods:** Here we report the inhibitory profile of two *R. microplus* (BrBmcys2b and
21
22 52 BrBmcys2c) and one *I. ovatus* (JpIocys2a) cystatins to commercial cathepsins B, C, and L.
23
24 53 The presence of native cystatins in *R. microplus* tissues was analyzed using sera against
25
26 54 recombinant BrBmcys2b and BrBmcys2c. Also, a peptide from JpIocys2a was synthesized
27
28 55 for rabbit immunization, and this serum was used to analyze the cross antigenicity between
29
30 56 *R. microplus* and *I. ovatus* cystatins.

31 57 **Results:** Enzymatic inhibition profile of tick cystatins shows a distinct modulation for
32
33 58 cathepsins related to tick blood digestion and evasion of host immune response.
34
35 59 Furthermore, BrBmcys2b was detected in saliva and different tissues along tick stages,
36
37 60 while BrBmcys2c was detected mainly in gut from partially engorged *R. microplus*
38
39 61 females, demonstrating a distinct pattern of cystatin expression, secretion and traffic
40
41 62 between tick tissues. Moreover, phylogenetic analysis suggests that JpIocys2a belongs to
42
43 63 the group of tick gut secreted cystatins. Finally, cross-antigenicity assays revealed that
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 64 antibodies against the JpIocys2a peptide recognize native and recombinant *R. microplus*
2
3 65 cystatins.
4

5
6 66 **Conclusion:** The presence of these proteins in different tissues and their ability to
7
8 67 differentially inhibit cathepsins suggest distinct roles for JpIocys2a, BrBmcys2b, and
9
10 68 BrBmcys2c in blood digestion, egg and larvae development, and modulation of host
11
12 69 immune response in tick physiology. The cross-antigenicity between native and
13
14 70 recombinant cystatins supports further experiments using JpIocys2a, BrBmcys2b, and
15
16 71 BrBmcys2c as vaccine antigens.
17
18
19
20

21 72 **Keywords:** inhibitor, cystatin, tick, *Rhipicephalus microplus*, *Ixodes ovatus*.
22
23
24
25 73
26
27

28 74 **Background**

29
30

31
32 75 Cystatins are tightly binding inhibitors of cysteine proteases [1]. In parasites, these
33
34 76 inhibitors are involved in internal protective and regulatory biological processes [2] as well
35
36 77 as in the modulation of the host's defense responses [3]. Classically, cystatins are divided
37
38 78 into three groups, known as stefin (type 1), cystatin (type 2), and kininogen (type 3),
39
40 79 although in ticks only stefins and cystatins have been reported [4]. It was only in recent
41
42 80 years that the physiological functions of tick cystatins [4,5] and their target cysteine
43
44 81 cathepsins [6,7] during tick blood-feeding, digestion and development became the object
45
46 82 of more consistent research. Previous studies have also demonstrated that tick cystatins
47
48
49 83 modulate host cathepsins involved in processes like inflammation, antigen processing and
50
51 84 presentation, phagocytosis, and cytokine expression [2]. The regulation of these
52
53 85 physiological processes by tick cystatins promotes blood uptake and survival of parasite
54
55 86 while it is attached to the host.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 87 The first tick cystatin biochemically or molecularly characterized was isolated
2
3 88 from *Amblyomma americanum* [8]. Back then, the participation of this cystatin was
4
5 89 implicated in host immunomodulation and tick protection to harmful ingested factors
6
7
8 90 during blood feeding. In *Ixodes scapularis*, two cystatins were biochemically
9
10 91 characterized, Sialostatin L and Sialostatin L2 [9,10]. Sialostatin L showed host immune
11
12 92 system modulation and cathepsins L, V, C, X, B, and papain inhibition, while Sialostatin
13
14 93 L2 inhibited cathepsins L, V, S, and C, showing higher expression rate in late feeding. The
15
16 94 enzymatic inhibition profile of *Haemaphysalis longicornis* cystatins for papain, cathepsins
17
18 95 L, B, H, as well as tick cathepsins have been characterized in previous research [7,11-14].
19
20
21 96 Furthermore, it was demonstrated that some of the cystatins from *H. longicornis* play a role
22
23 97 in innate immunity [11] and blood feeding [7,14]. Cystatins from *Ornithodoros moubata*
24
25 98 were able to inhibit cathepsins B, L, S, H, and C [15,16], and affect T-cell and dendritic
26
27 99 cells proliferation and cytokine release [16]. Additionally, it was suggested that one
28
29
30 100 *Rhipicephalus appendiculatus* cystatin present in nymph, male and female gut after feeding
31
32
33 101 is involved in blood digestion process [17]. Taken together, these results indicate that
34
35 102 cystatins play widespread and distinct regulatory roles in different tick species.
36
37
38
39
40

41 103 *Rhipicephalus microplus* is one of the most consistently studied cattle tick species,
42
43 104 mainly because of the potentially expressive economic losses it causes in the livestock
44
45 105 industry [18]. However, despite the great interest in understanding the physiology of this
46
47 106 tick, few studies have analyzed *R. microplus* cystatins. Some *R. microplus* cysteine
48
49 107 proteases were identified and characterized [19-21], demonstrating the importance of these
50
51 108 enzymes in a variety of physiological processes and parasite stages. Nevertheless, few *R.*
52
53 109 *microplus* cystatins and its target cysteine proteases have been characterized, including
54
55 110 only one type 2 cystatin [5], named Rmcystatin-3. Rmcystatin-3 is expressed in tick fat
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 111 body, salivary glands, and hemocyte, though it inhibits cathepsin L, B, and BmCl-1, a gut
2
3 112 *R. microplus* cysteine endopeptidase [19], which suggests its role in tick blood digestion.
4
5 113 Consequently, the control of *R. microplus* cysteine proteases activities by cystatins remains
6
7
8 114 essentially unknown. In a previous work [22] we analyzed the sequence properties and
9
10 115 immunogenicity of putative cystatins from *R. microplus*. These cystatins showed a high
11
12 116 degree of homology among *Rhipicephalus* spp., differential RNA expression patterns in
13
14 117 tick tissues, as well as cross-reactivity between them, suggesting the existence of shared
15
16 118 epitopes.
17
18
19
20

21 119 The tick *Ixodes ovatus* geographic prevalence has been reported in Southeast Asia
22
23 120 countries [23,24]. Its main hosts are humans, and bite cases have been observed in Tibet,
24
25 121 Burma, Nepal, Japan, and China [25]. *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia* species, which
26
27 122 are the causal agents of Lyme disease and ehrlichiosis, respectively, are transmitted by
28
29 123 ixodid ticks, and *I. ovatus* was found to be infected with *Borrelia* and *Ehrlichia* species
30
31 124 [26-28]. However, no human cases of Lyme disease and ehrlichiosis transmitted by *I.*
32
33 125 *ovatus* have been confirmed to date [27]. Also, no cystatins were characterized for this tick
34
35
36 126 species so far.
37
38
39
40

41 127 Tick control is a great challenge in livestock and public health management
42
43 128 worldwide, and relies on the use of synthetic acaricides [29]. In spite of that, vaccines have
44
45 129 emerged as an interesting alternative method to decrease tick populations and the incidence
46
47 130 of tick-borne diseases in the environment [30]. Since hosts in several regions are exposed
48
49 131 to multi-tick infestation, the development of a single vaccine against multiple species may
50
51 132 be advantageous in control strategies against these parasites. A number of vaccination
52
53
54 133 experiments showed the potential use of tick proteins to protect hosts against more than
55
56
57 134 one tick species, demonstrating the feasibility of induction of cross-protection [31]. These
58
59
60
61
62
63
64
65

1 135 tick protective proteins are present in many physiological processes, like Bm86, a gut
2
3 136 protein of unknown function [32]; glutathione-S transferase, an enzyme responsible to
4
5 137 detoxification of cell xenobiotic compounds [33]; ferritins, iron-storage proteins [34]; a
6
7
8 138 cement protein named 64TRP [35]; and subolesin, a gene-expression regulator [36]. In
9
10 139 fact, some of these tick antigens, such as Bm86 and its homologues, developed a higher
11
12 140 protective host immune response to different tick species, rather than the tick species from
13
14 141 which the antigen was isolated [31]. Vaccination trials using cystatins as antigens were
15
16 142 performed against *I. scapularis* [37] and *Ornithodoros moubata* [16] infestations, showing
17
18 143 the potential of these inhibitors to compose a vaccine against ticks. Despite the importance
19
20 144 of cross antigenicity analysis as a preliminary step to detect multi-species antigen
21
22 145 candidates, the potential of cross-protection induced by tick cystatins has yet to be
23
24 146 analyzed.

25
26
27
28
29
30 147 In order to improve the understanding of the physiological roles of cystatins and the
31
32 148 potential of these inhibitors as antigen in a multi-species vaccine, we characterized the
33
34 149 inhibitory profile, tissue expression, and cross-antigenicity of a new *I. ovatus* cystatin,
35
36 150 JpIocys2a, and two *R. microplus* cystatins, BrBmcys2b and BrBmcys2c. The presence of
37
38 151 these proteins in different tick tissues and their ability to differently inhibit cathepsins
39
40 152 suggest distinct roles for JpIocys2a, BrBmcys2b, and BrBmcys2c in blood digestion and
41
42 153 modulation of host immune response in tick physiology. The cross-antigenicity among
43
44 154 cystatins from these two tick species paves the way for further experiments using
45
46 155 JpIocys2a, BrBmcys2b, and BrBmcys2c as vaccine antigens.

156 **Methods**

157 **Animals and ticks**

59
60
61
62
63
64
65

1 158 Partially and fully engorged female ticks (Porto Alegre *R. microplus* strain) were
2
3 159 collected from Hereford (*Bos taurus taurus*) cattle for tissue dissection. Partially engorged
4
5 160 *R. microplus* females weighing between 25 and 60 mg were recovered manually from
6
7
8 161 calves [38]. New Zealand White rabbits and Hereford cattle were housed at the Faculdade
9
10 162 de Veterinária of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. The experiments
11
12 163 were approved and conducted following the guidelines of the Ethics Committee on Animal
13
14 164 Experimentation of the same university. *I. ovatus* adult ticks were collected by flagging
15
16 165 from the lower vegetation in forests in Hokkaido, Japan, and maintained by experimental
17
18 166 infestation on hamsters to full engorgement. Hamsters were maintained in a P3 animal
19
20 167 facility at Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University in accordance
21
22 168 with the Institutional Animal Care and Use Committee guidelines.
23
24
25
26
27
28
29

30 170 **Cloning of cystatin ORF sequences**

31
32 171 For cloning of the *JpIocys2a* sequence, primers 5'-
33
34 172 GACTAGTCGCCAGCACGATGGCT-3' (forward) and 5'-
35
36 173 TGTCATTTAACATGCGGCTGACGTC-3' (reverse) were designed based on TIGR
37
38 174 nucleotide database (TC51659) from *I. scapularis* gene sequence with high similarity to
39
40 175 cystatins. One ORF was amplified by RT-PCR from *I. ovatus* ovary RNA and cloned in
41
42 176 pGEM-T vector (Promega). For cloning the DNA sequence encoding the mature JpIocys2a
43
44 177 protein in the expression vector, the plasmid pGEM-T-JpIocys2a was amplified using the
45
46 178 primers 5'-TTTTTGGATCCGGGTCGGCGAGCAGGTC-3' (forward) and 5'-
47
48 179 AAAAAGAATTCCTAGACATTATTAGGAGCTTCGCAGTGGTAG-3' (reverse). The
49
50 180 PCR product was hydrolyzed with *Bam*HI and *Eco*RI (Invitrogen) restriction enzymes and
51
52 181 separated by electrophoresis on 0.8% agarose gel. The 396-bp fragment was excised,
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 182 purified using the GeneClean II Kit (Qbiogene), and ligated into plasmid pGEX-4T-1 (GE
2
3 183 Healthcare) downstream the Glutathione S-transferase (GST) gene, which codifies the
4
5 184 fusion protein. The plasmid pGEX-4T-1-JpIocys2a was transformed into *Escherichia coli*
6
7
8 185 XL1BLUE strain. Transformed cells were plated and cultivated in LB agar containing
9
10 186 ampicillin and chloramphenicol (50µg/mL). The plasmid was purified and the cloned
11
12 187 product was confirmed by sequencing.

13
14
15 188 The BrBmcys2b and BrBmcys2c nucleotide sequences were previously cloned
16
17
18 189 [22]. In short, cystatin-coding regions were amplified by PCR from *R. microplus* salivary
19
20 190 gland cDNA and cloned into plasmid pET-5a (Novagen).

21
22
23 191

24 25 192 ***In silico* analyses**

26
27 193 JpIocys2a DNA sequence analysis, amino acid predictions, and sequences
28
29 194 alignment were conducted using the BioEdit version 7.2.5 software [39]. The cystatin
30
31 195 antigenic index was calculated using the Jameson–Wolf algorithm in the software
32
33 196 LASERGENE, version 7.0.0, to predict antigenic determinants by combining existing
34
35 197 methods for protein structural predictions [40]. For phylogenetic analysis, an unrooted
36
37 198 neighbor-joining phylogenetic tree was created using the MEGA software, version 5 [41].
38
39 199 Bootstrap support was assessed using 1000 replicates. The GenBank accession numbers for
40
41 200 cystatins used in analysis were: *R. microplus* BrBmcys2b [GenBank: KC816580], *R.*
42
43 201 *microplus* BrBmcys2c [GenBank: KC816581], *R. microplus* Rmcystatin-3 [GenBank:
44
45 202 AIX97454]; *I. ovatus* JpIocys2a [GenBank: KP253747]; *I. scapularis* sialostatin 1
46
47 203 [GenBank: AF483724], *I. scapularis* sialostatin 2 [GenBank: DQ066048]; *H. longicornis*
48
49 204 Hlcyst-2 [GenBank: DQ364159], *H. longicornis* Hlcyst-3[GenBank: EU426545].
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

206 **Peptide synthesis**

207 To raise antibodies against conserved and exposed regions among tick cystatins, a
208 peptide with 14 amino acids from the JpIocys2a amino acid sequence was synthesized
209 (STQpep). Antigenic analysis of cystatins and percentage of identity among JpIocys2a,
210 BrBmcys2a, BrBmcys2b, Brbmcys2c, and other tick cystatins were used to select the
211 peptide. Peptides were kindly provided by Maria Aparecida Juliano, Department of
212 Biophysics, Federal University of São Paulo (UNIFESP), SP, Brazil. An automated bench-
213 top simultaneous multiple solid-phase peptide synthesizer (PSSM 8 system, Shimadzu)
214 was used for the solid-phase synthesis of the peptides by the Fmoc-procedure. Final
215 peptides were deprotected in trifluoroacetic acid and purified by semipreparative HPLC
216 using an Econosil C-18 column. Analytical HPLC was performed using a binary HPLC
217 system from Shimadzu with a SPD-10AV Shimadzu uv-vis detector, coupled to an
218 Ultrasphere C-18 column. The HPLC column elutes were monitored by their absorbance at
219 220 nm. The molecular weight and purity of synthesized peptides were checked by
220 MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltons) or electron spray LC/MS-2010
221 (Shimadzu) [42,43].

223 **Expression and purification of recombinant cystatins**

224 *E. coli* C41 (DE3), C43 (DE3) and RIL strains were transformed with plasmids
225 containing the BrBmcys2b, BrBmcys2c, and JpIocys2a sequences, respectively. The
226 recombinant proteins BrBmcys2b and BrBmcys2c were expressed in SOB medium with
227 0.4 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyrano (IPTG) for 16 h at 25 °C. rGST-JpIocys2a
228 protein was expressed in LB medium with 0.1 mM IPTG for 24 h at 37 °C. Cells were
229 further harvested by centrifugation at 10,000 x g for 10 min at 4 °C. rBrBmcys2b and

1 230 rBrBmcys2c were resuspended in phosphate buffer containing 100 mM of imidazole (lysis
2
3 231 buffer) and rGST-JpIocys2a in PBS. For cell lysis, the suspension was sonicated five times
4
5 232 for 30 s at 40 MHz on ice (Sonics or Qsonica, respectively). The soluble and insoluble
6
7 233 fractions were separated by centrifugation at 10,000 x g for 10 min at 4 °C (Hitachi).
8
9

10
11 234 The soluble fractions containing the rBrBmcys2b and rBrBmcys2c were purified by
12
13 235 nickel-chelating Sepharose chromatography (GE Healthcare). Briefly, the soluble fractions
14
15 236 were filtered in 0.45- μ m filters (Whatman) and then applied into the columns previously
16
17 237 equilibrated with phosphate lysis buffer. Proteins of interest were eluted with phosphate
18
19 238 buffer containing 150 mM of imidazole at room temperature. Eluted fractions were
20
21 239 purified using centrifugal filter devices (Centricon YM10 - 50,000 MW cut-off, Millipore),
22
23 240 lyophilized and dialyzed against PBS. The soluble fractions containing the rGST-
24
25 241 JpIocys2a was purified by Glutathione Sepharose4B (Amersham Bioscience) and eluted
26
27 242 with 50mM Tris-HCl buffer and 10 mM glutathione, in pH 8.0. Purified rGST-JpIocys2a
28
29 243 was dialyzed in cleavage buffer (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄
30
31 244 1.8mM, pH 7.3) and cleaved by Thrombin (0.01u/ μ g; Sigma). rGST fusion protein was
32
33 245 bound by Glutathione Sepharose 4B, and pure rJpIocys2a was recovered in the
34
35 246 supernatant. Protein concentrations were determined using the BCA Protein Assay kit
36
37 247 (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions.
38
39
40
41
42
43
44
45

46 248 **Enzymatic assays**

47
48
49 249 Remaining enzymatic activity and apparent dissociation constants (K_Is) were
50
51 250 estimated using different cathepsins (Sigma) to determine the inhibitory profile of
52
53 251 rBrBmcys2b, rBrBmcys2c, and rJpIocys2a. Enzymes were preincubated with recombinant
54
55 252 cystatins at different concentrations ranging from 10 to 500 nM in the corresponding assay
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 253 buffer for 15 min, and protease-specific substrates (Sigma) were added to estimate residual
2
3 254 enzyme activity. Enzymes concentrations are presented in Table 1. Assay buffer and
4
5 255 enzymes were used as follows: 100 mM sodium acetate, pH 5.5, 100 mM NaCl, 1 mM
6
7
8 256 EDTA, and 0.005% TritonX-100 for bovine cathepsin C and human cathepsin L; 100 mM
9
10 257 sodium acetate, pH 5.5, 60 mM NaCl, 1 mM EDTA for bovine cathepsin B; 100 mM
11
12
13 258 HEPES, pH 7.5, 1 mM EDTA for human cathepsin G. For KIs determination, substrates
14
15 259 were used as follows: Z-Phe-Arg-MCA (0.012-0.1 mM) for cathepsin L; Z-Arg-Arg-pNA
16
17
18 260 (0.012-1.0 mM) for cathepsin B; Gly-Phe-pNA (0.6-2.25mM) for cathepsin C; N-Succinyl-
19
20 261 Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (0.67 mM) for cathepsin G. Chromogenic (405 nm of absorption)
21
22 262 and fluorescence intensity (370 and 460 nm for emission and excitation, respectively)
23
24 263 assays were monitored in a microplate spectrophotometer (Spectramax Microplate Reader,
25
26 264 Molecular Devices Corporation). Data were fit for appropriate tight-binding inhibitors
27
28
29 265 using a nonlinear regression analysis equation (Morrison, 1969) performed using
30
31 266 GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software).
32
33
34
35
36

267

268 **Tick tissues extraction**

37
38
39
40
41 269 Salivary glands, ovary, gut, fat body and larvae were disrupted and homogenized
42
43 270 using a mortar and pestle in an ice bath with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2. The
44
45 271 homogenate was centrifuged at $16,000 \times g$ for 15 min at 4 °C to remove the insoluble
46
47
48 272 material. Next, the soluble supernatant fraction was collected. The protein extracts were
49
50 273 prepared according to the method previously described [44]. Tick hemolymph was
51
52
53 274 collected as follows: engorged *R. microplus* females were washed in alcohol 70 %, fixed to
54
55 275 Petri dishes and kept at 4°C; the cuticle was slit with a razor blade and the exuding
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 276 hemolymph recovered and stored at -20°C. Saliva was collected by pilocarpine injection as
2
3 277 previously described [45].
4
5

6 278 **Immunization of hamsters and rabbits**

7
8
9
10 279 Two hamsters were subcutaneously inoculated with 50 µg of rBrBmcys2c or PBS.
11
12 280 Immunizations consisted of four doses at 14-day intervals with the recombinant proteins
13
14 281 emulsified in Freund's incomplete adjuvant. Two rabbits were subcutaneously immunized
15
16 282 four times at 14-day intervals with 625 µg of STQpep conjugated with carrier protein
17
18 283 keyhole limpet hemocyanin (KLH; Sigma) or 200µg of GST from *H. longicornis* [46] both
19
20 284 emulsified in Marcol-Moltanide (Exxon Mobil Corporation) adjuvant. Hamsters and rabbit
21
22 285 blood were collected 14 days after the last booster, and sera were separated by centrifuging
23
24 286 samples at 10,000 × g for 5 min at 4°C. Serum aliquots were preserved at -20°C upon use.
25
26 287 Mice sera used in serological analysis were produced in a previous study [22].
27
28
29
30

31 288 **SDS-PAGE and Western blotting**

32
33
34
35
36 289 The production of recombinant cystatins and the presence of native cystatin in
37
38 290 tissues were analyzed by SDS-PAGE [47] and Western blot [48]. For Western blot
39
40 291 analyses, recombinant cystatins (1 µg protein/lane), saliva (20 µg protein/lane),
41
42 292 hemolymph (60 µg protein/lane) and tissue extracts (150 µg protein/lane) were resolved in
43
44 293 14% gel for SDS-PAGE, followed by transference to nitrocellulose membranes. The
45
46 294 membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in PBS and further incubated with
47
48 295 mice, hamster or rabbit sera diluted to 1:50. Additionally, for rBmcys2b, rBmcys2c, and
49
50 296 rJpIocys2a detection, anti-histidine tag or anti-GST-HI antibodies (1:2,000) were used.
51
52 297 After primarily sera incubations, anti-IgG species specific alkaline phosphatase (mouse
53
54 298 and rabbit sera) and peroxidase (hamster serum) conjugates (1:5,000) were used as
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 299 secondary antibodies. Alkaline phosphatase revelations were performed with NBT (nitro
2
3 300 blue tetrazolium) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Sigma) in PBS.
4
5 301 Peroxidase revelations were performed with DAB (3,3'-diaminobenzidine
6
7
8 302 tetrahydrochloride), H₂O₂ and CoCl₂ in PBS.
9

10 11 303 **Results**

12 13 14 15 304 **JpIocys2a identification and sequence analyses**

16
17
18 305 JpIpcys2a nucleotide sequence showed an ORF of 423 bp, and the deduced amino
19
20
21 306 acid sequence contained a signal peptide with cleavage site between amino acid residues
22
23 307 18 and 19 and four cysteine residues with a theoretical molecular weight of 15.6 kDa
24
25
26 308 (Figure 1). The G residue on N-terminal, the motif QxVxG and the PW at the C-terminal
27
28 309 are characteristic of family 2 cystatins, and are also conserved in JpIocys2a. The SND
29
30
31 310 inhibitory domain, which inhibits legumain/asparaginyl endopeptidases found in human
32
33 311 cystatin C, is absent in JpIocys2a, like other tick cystatins [4].
34
35

36
37 312

38 39 40 313 ***In silico* antigenicity of cystatins and peptide selection**

41
42
43 314 The alignment of JpIocys2a with *R. microplus* cystatins showed conserved regions
44
45 315 among the predicted amino acid sequences (Figure 2). The amino acid sequence
46
47
48 316 STQVEGREYYDTVL from JpIocys2a (STQpep) was selected for peptide synthesis in
49
50 317 accordance with the highest identity and antigenic region among all cystatins analyzed.
51
52

53
54 318

55 56 57 319 **Production of recombinant cystatins**

58
59
60
61
62
63
64
65

1 320 Soluble recombinant BrBmcys2b, BrBmcys2c, and GST-JpIocys2a were expressed
2
3 321 in *E. coli* and purified by affinity chromatography. rGST-JpIocys2a was cleaved from
4
5 322 GST-tag by thrombin and the purified rJpIocys2a was recovered (Figure 3). SDS-PAGE
6
7 323 showed that the conjugated rGST-JpIocys2a protein weight was about 42kDa (30 kDa
8
9 324 from rGST plus 12kDa from rJpIocys2a), while the weight of cystatins was approximately
10
11 325 12kDa. These data are in accordance with *in silico* molecular weights estimation.
12
13 326 rBrBmcys2b and rBrBmcys2c were recognized by anti-histidine tag antibodies, and rGST-
14
15 327 JpIocys2a was recognized by anti-GST-HI in Western blot assay. The purified recombinant
16
17 328 cystatins were subsequently used in inhibitory and immunization assays.
18
19
20
21
22
23
24
25
26

329

330 **rJpIocys2a, rBrBmcys2b, and rBrBmcys2c inhibitory profile**

331 Inhibitory assays were performed to characterize the specificity of rJpIocys2a,
332 rBrBmcys2b, and rBrBmcys2c for target enzymes (Figure 4 and Table 1). rJpIocys2a,
333 rBrBmcys2b, and rBrBmcys2c modulated the activity of mammal cathepsins B, C, and L
334 at distinct patterns. rJpIocys2a and rBrBmcys2b inhibited all cysteine cathepsins, showing
335 higher affinity for cathepsin L and B, respectively (Table 1). In contrast, rBrBmcys2c did
336 not inhibit cathepsin B, showing higher affinity for cathepsin C. Also, rJpIocys2a,
337 rBrBmcys2b, and rBrBmcys2c inhibited these peptidases with apparent inhibition
338 constants between 0.45 and 154.7 nM. The exception was rJpIocys2a, which shows K_i
339 higher than 1 μ M for cathepsin C. Cathepsin G, a serine protease, was not inhibited by
340 these recombinant cystatins.

341

342 **Recognition of native and recombinant cystatins by hyperimmune sera**

61
62
63
64
65

1 343 Sera against STQpep, rBrBmcys2b and rBrBmcys2c were used to determine the
2
3 344 presence of cystatins in *R. microplus* tissues as well as the cross-antigenicity between
4
5 345 peptide, native, and recombinant cystatins (Figure5). Native cystatins present in saliva,
6
7 346 larvae, ovary, gut, salivary glands, and fat body (apparent molecular mass of 12kDa) were
8
9 347 differentially recognized by these sera. Native cystatins were recognized by anti-
10
11 348 rBrBmcys2b in all tissues (Figure5A), whereas anti-rBrBmcys2c sera recognized cystatins
12
13 349 in gut from partially engorged females and in ovary, salivary glands and fat body from
14
15 350 fully engorged females (Figure5B). rBrBmcys2b and native cystatins from partially and
16
17 351 fully engorged female salivary glands were recognized by anti-STQpep sera (Figure5C).
18
19 352 The hosts sera inoculated with PBS did not recognize native cystatins in these tissues (data
20
21 353 not shown). Furthermore, anti-rBrBmcys2b serum detected cystatin in hemolymph (Figure
22
23 354 5A), unlike anti-rBrBmcys2c and negative controls sera. Since these sera were raised
24
25 355 against STQpep and recombinant cystatins, this recognition shows the cross-antigenicity
26
27 356 between native and peptide/recombinant cystatins.
28
29
30
31
32
33
34
35

36 357 **Phylogenetic analysis**

37
38
39 358 A neighbor-joining tree constructed with cystatin amino acid sequences from
40
41 359 Ixodidae ticks is shown in Figure 6. We selected sequences of cystatins that have
42
43 360 inhibitory profile and tissue localization that have been characterized. In the tree
44
45 361 constructed, BrBmcys2b and BrBmcys2c grouped with other cystatins present in
46
47 362 saliva/salivary glands and gut, respectively, showing tissue localization conservation
48
49 363 between cystatin from the two branches of the tree. JpIocys2a grouped with the branch of
50
51 364 cystatins expressed mainly in gut, suggesting the importance of this cystatin in tick blood
52
53 365 digestion. All these cystatin are cathepsin L inhibitors, whereas cystatins that inhibit
54
55 366 cathepsin B and C are present in the two branches.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

367 Discussion

368 The function of cystatins in parasite physiological processes is a subject of
369 increasing interest among many research groups [3,49]. In ticks, however, only in recent
370 years did cystatin roles begin to be elucidated [4]. The main goals of these works were the
371 characterization of cathepsin targets, tissue localization and immune system modulation by
372 tick cystatins. To date, no *I. ovatus* and only two *R. microplus* cystatin were biochemically
373 characterized [5,50]. In the present work, we characterized the inhibition profile of one *I.*
374 *ovatus* and two *R. microplus* cystatins. To uncover the inhibitory profile of these cystatins,
375 we selected three cysteine proteases involved in host hemoglobin proteolytic degradation
376 cascade by ticks [51-53]. In enzymatic inhibition assays, rBrBmcys2b inhibited cathepsins
377 B, C, and L activities, and was detected in all tissues and secretions analyzed, suggesting
378 the broad enzymatic regulation by this inhibitor in *R. microplus* physiology. Among the
379 tissues from partially engorged females analyzed, BrBmcys2c was detected only in gut,
380 suggesting the role of BrBmcys2c in blood metabolism. A potential target for this cystatin
381 could be BmCL1, VTDC1 and/or RmLCE, cathepsins from *R. microplus* that were
382 detected in tick gut during feeding stages [19,20,54]. The pattern of native BrBmcys2b and
383 BrBmcys2c expression corroborates previous qPCR results, which showed a higher mRNA
384 transcripts expression in gut, as compared to other tick tissues [22]. The presence of
385 BrBmcys2b in tissue that showed no transcription for this cystatin gene maybe the result of
386 cystatin synthesis in gut, and its subsequent exportation to other tissues, similarly to other
387 tick proteins [21,55,56]. The presence in hemolymph of BrBmcys2b, but not BrBmcys2c,
388 supports this hypothesis. JpIocys2a inhibited cathepsins B, C and L at different levels.
389 Cathepsin L and B were highly inhibited, when compared to C inhibition. The
390 phylogenetic tree analysis show that JpIocys2a grouped together with gut cystatins,

1 391 indicating that JpIocys2a could be secreted in *I. ovatus* gut lumen. In *Ixodes ricinus* blood
2
3 392 digestion, cathepsins B and L hydrolyze hemoglobin secondary large fragments, whereas
4
5 393 cathepsin C degrades it down to small fragments [51]. Therefore, JpIocys2a may have
6
7
8 394 major importance during modulation of initial hemoglobin degradation in blood digestion
9
10 395 by ticks.

11
12
13
14 396 *In vitro* and *in vivo* experiments have demonstrated the role of tick cystatins in the
15
16 397 modulation of host immune system components responsible for anti-parasite infestation
17
18 398 [10,16,57]. Similarly to Sialostatin L2[37], rBrBmcys2b and rBrBmcys2c were not
19
20
21 399 recognized by sera of tick-infested hosts (data not shown), indicating that the *R. microplus*
22
23 400 cystatins are not immunogenic for bovines when inoculated through tick bite. The presence
24
25 401 of BrBmcys2b in *R. microplus* saliva as well as its ability to inhibit cathepsin L suggests
26
27 402 the participation of this cystatin in mechanisms to avoid host immune system. Cathepsin L
28
29 403 is involved in mammal immune system process by MHC class II-presentation pathway
30
31 404 regulation [58], as well as extracellular matrix breakdown during inflammation [59].
32
33 405 Cathepsin L secreted by macrophages inside tick feeding cavity would destroy host tissue
34
35 406 elasticity, which is required for the effective parasite attachment [10]. Inhibition of
36
37 407 cathepsin L by secreted tick cystatins would help tick feeding, whereas the absence of
38
39 408 these compounds would result in inflammation and parasite rejection due to the host's
40
41 409 immune response. This outcome was observed in tick cystatin knock-down and vaccination
42
43 410 experiments [8,10,16,37]. Consequently, host cathepsin L inhibition would result in a
44
45 411 weaker immune response against tick infestation. The presence of BrBmcys2bin partially
46
47 412 and fully engorged female ovary indicated that this cystatin is important during egg
48
49 413 development. In ovary, a vitellin degrading cysteine endopeptidase (VTDCE) that plays a
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 414 crucial physiological role in egg maturation through vitellin mobilization [21,54] is a
2
3
4 415 potential enzyme target for BrBmcys2b.
5

6
7 416 *In silico* and *in vitro* comparative cross-antigenicity analyses of tick proteins, as
8
9 417 CRTs [60], or GSTs [61], showed that, despite their high amino acid sequence
10
11 418 conservation between homologues, these proteins display different immunodominant
12
13 419 epitopes. Furthermore, antibodies against CRT and GST from *H. longicornis* were able to
14
15 420 recognize native and recombinant forms of *R. microplus* homologous proteins [60,61].
16
17 421 Moreover, when GST-HI was used in a vaccination trial against *R. microplus* infestation in
18
19 422 cattle, the number of engorged females decreased by around 50% [61]. To select
20
21 423 immunodominant epitopes to explore the potential of cystatin in an anti-tick vaccine, a
22
23 424 peptide from JpIocys2a was synthesized based on their antigenicity and similarity with *R.*
24
25 425 *microplus* cystatins, and used for rabbit immunization. This approach seems to be
26
27 426 interesting, because the immune response generated against designed peptide could be
28
29 427 directed to immunodominant protective epitopes in native proteins. Synthetic peptide
30
31 428 based vaccines have been studied as a strategy against malaria [62], hepatitis C [63,64],
32
33 429 foot-and-mouth disease [65], human papilloma virus [66] and *Toxoplasma gondii* [67].
34
35 430 Vaccination experiments using synthetic peptide from *R. microplus* Bm86 and
36
37 431 *Plasmodium falciparum* also induced antibodies that recognized proteins from which the
38
39 432 amino acid sequence had originated [68]. Furthermore, the peptides selected from *R.*
40
41 433 *microplus* Bm86 developed a protection in cattle ranging between 36% and 81% [68]. In
42
43 434 this work, STQ-pep immunization generating antibodies that recognize native and
44
45 435 recombinant *R. microplus* cystatins showed cross-reactivity in the selected peptide region.
46
47 436 The results reveal that the peptide construct is immunogenic, allowing to recognize
48
49 437 rJpIocys2a by anti-STQpep antibodies. The cross-reaction of STQ-pep with native
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 438 cystatins from *R. microplus* salivary glands and rBrBmcys2b paves the way for further
2
3 439 works testing this peptide for a cross-antigenic vaccine.
4
5

6 440 Conclusions

7
8
9
10 441 This work showed the differential presence of cystatins in *R. microplus* tick tissues,
11
12 442 and demonstrates that cathepsins B, C, and L are modulated by JpIocys2a, BrBmcys2b,
13
14 443 and BrBmcys2c to different degrees. These results suggest distinct tick physiological roles
15
16
17 444 for these cystatins: BrBmcys2b acts during blood meal processing, egg and larva
18
19 445 development, and in host immune system modulation; and BrBmcys2c and JpIocys2a act
20
21 446 mainly during blood meal processing. Future anti-hemostatic and immunomodulatory
22
23 447 experiments will better clarify the importance of JpIocys2a, BrBmcys2b, and BrBmcys2c
24
25 448 in tick physiology.
26
27
28
29

30 449

31 450 **Competing interests**

32
33
34
35
36
37 451 The authors declare that they have no competing interests.
38
39

40 452

41 453 **Authors' contributions**

42
43
44 454 LFP, GAS, MFA, and AS carried out the experiments. LFP, GAS, CL, AM, and ISV
45
46 455 designed the study. LFP, GAS, MFA, AS, CL, SK, KO, OM, and ISV drafted the
47
48 456 manuscript. All authors read and approved the final manuscript.
49
50
51

52 457

53 458 **Acknowledgments**

54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 459 This work was supported by grants from CNPq-Instituto Nacional de Ciência e
 2
 3 460 Tecnologia de Entomologia Molecular, FINEP, CAPES, CNPq, FAPERJ and FAPERGS
 4
 5
 6 461 (Brazil), and MEXT (Japan). We would like to thank Dr. Carlos Termignoni and Msc.
 7
 8 462 Lucas Tirloni for their assistance in enzymatic assays.
 9

10 463 References

- 11
 12
 13
 14 464
 15 465 1. Nicklin MJ, Barrett AJ: **Inhibition of Cysteine Proteinases and Dipeptidyl**
 16 466 **Peptidase I by Egg-White Cystatin.** *Biochem J* 1984, **223**(1):245-253.
 17
 18 467 2. Zavasnik-Bergant T: **Cystatin protease inhibitors and immune functions.** *Front*
 19 468 *Biosci* 2008, **13**:4625-4637.
 20
 21
 22 469 3. Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM: **Helminth immunoregulation: The role of**
 23 470 **parasite secreted proteins in modulating host immunity.** *Mol Biochem*
 24 471 *Parasitol* 2009, **167**(1):1-11.
 25
 26
 27 472 4. Schwarz A, Valdes JJ, Kotsyfakis M: **The role of cystatins in tick physiology and**
 28 473 **blood feeding.** *Ticks Tick Borne Dis* 2012, **3**(3):117-127.
 29
 30 474 5. Lu S, Soares TS, Vaz IS, Lovato DV, Tanaka AS: **Rmcystatin3, a cysteine protease**
 31 475 **inhibitor from *Rhipicephalus microplus* hemocytes involved in immune**
 32 476 **response.** *Biochimie* 2014, **106C**:17-23.
 33
 34
 35 477 6. Renard G, Lara FA, de Cardoso FC, Miguens FC, Dansa-Petretski M, Termignoni C,
 36 478 Masuda A: **Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus***
 37 479 **cathepsin L-like enzyme.** *Insect Mol Biol* 2002, **11**(4):325-328.
 38
 39
 40 480 7. Yamaji K, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Alim MA, Anisuzzaman M,
 41 481 Kushibiki S, Fujisaki K: **A salivary cystatin, HISC-1, from the ixodid tick**
 42 482 ***Haemaphysalis longicornis* play roles in the blood-feeding processes.**
 43 483 *Parasitol Res* 2009, **106**(1):61-68.
 44
 45 484 8. Karim S, Miller NJ, Valenzuela J, Sauer JR, Mather TN: **RNAi-mediated gene**
 46 485 **silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood**
 47 486 **feeding.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **334**(4):1336-1342.
 48
 49
 50 487 9. Kotsyfakis M, Sa-Nunes A, Francischetti IMB, Mather TN, Andersen JF, Ribeiro
 51 488 **JMC: Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L,**
 52 489 **a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*.** *Journal of Biol Chem*
 53 490 2006, **281**(36):26298-26307.
 54
 55
 56 491 10. Kotsyfakis M, Karim S, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JMC: **Selective cysteine**
 57 492 **protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes***
 58 493 ***scapularis*.** *Journal of Biol Chem* 2007, **282**(40):29256-29263.
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65

- 1 494 11. Zhou J, Liao M, Ueda M, Gong H, Xuan X, Fujisaki K: **Characterization of an**
2 495 **intracellular cystatin homolog from the tick *Haemaphysalis longicornis*.**
3 496 *Vet Parasitol* 2009, **160**(1-2):180-183.
- 4
5
6 497 12. Zhou J, Liao M, Gong H, Xuan X, Fujisaki K: **Characterization of Hlcyst-3 as a**
7 498 **member of cystatins from the tick *Haemaphysalis longicornis*.** *Exp Appl*
8 499 *Acarol* 2010, **51**(4):327-333.
- 9
10 500 13. Zhou JL, Ueda M, Umemiya R, Battsetseg B, Boldbaatar D, Xuan XA, Fujisaki K: **A**
11 501 **secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct**
12 502 **expression patterns in relation to innate immunity.** *Insect Biochem Mol*
13 503 *Biol* 2006, **36**(7):527-535.
- 14
15
16 504 14. Yamaji K, Tsuji N, Miyoshi T, Hatta T, Alim MA, Anisuzzaman, Kushibiki S,
17 505 Fujisaki K: **Hlcyst-1 and Hlcyst-2 are potential inhibitors of HICPL-A in**
18 506 **the midgut of the Ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*.** *J Vet Med Sci*
19 507 2010, **72**(5):599-604.
- 20
21
22 508 15. Grunclova L, Horn M, Vancova M, Sojka D, Franta Z, Mares M, Kopacek P: **Two**
23 509 **secreted cystatins of the soft tick *Ornithodoros moubata*: differential**
24 510 **expression pattern and inhibitory specificity.** *Biol Chem* 2006,
25 511 **387**(12):1635-1644.
- 26
27
28 512 16. Salat J, Paesen GC, Rezacova P, Kotsyfakis M, Kovarova Z, Sanda M, Majtan J,
29 513 Grunclova L, Horka H, Andersen JF, Brynda J, Horn M, Nunn MA, Kopacek
30 514 P, Kopecky J, Mares M: **Crystal structure and functional characterization**
31 515 **of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick**
32 516 ***Ornithodoros moubata*.** *Biochem J* 2010, **429**:103-112.
- 33
34
35 517 17. Imamura S, Konnai S, Yamada S, Parizi LF, Githaka N, Vaz ID, Murata S, Ohashi
36 518 **K: Identification and partial characterization of a gut *Rhipicephalus***
37 519 ***appendiculatus* cystatin.** *Ticks Tick Borne Dis* 2013, **4** (1-2):138-144.
- 38
39
40 520 18. Grisi L, Leite RC, Martins JRD, de Barros ATM, Andreotti R, Cancado PHD, de
41 521 Leon AAP, Pereira JB, Villela HS: **Reassessment of the potential economic**
42 522 **impact of cattle parasites in Brazil.** *Rev Bras Parasitol Vet* 2014, **23**(2):150-
43 523 156.
- 44
45
46 524 19. Renard G, Garcia JF, Cardoso FC, Richter MF, Sakanari JA, Ozaki LS, Termignoni
47 525 C, Masuda A: **Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus***
48 526 **cathepsin L-like enzyme.** *Insect Biochem Mol Biol* 2000, **30**(11):1017-1026.
- 49
50
51 527 20. Estrela A, Seixas A, Termignoni C: **A cysteine endopeptidase from tick**
52 528 **(*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) larvae with vitellin digestion**
53 529 **activity.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2007, **148**(4):410-416.
- 54
55 530 21. Seixas A, Estrela AB, Ceolato JC, Pontes EG, Lara F, Gondim KC, Termignoni C:
56 531 **Localization and function of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* vitellin-**
57 532 **degrading cysteine endopeptidase.** *Parasitology* 2010, **137**(12):1819-1831.
- 58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 533 22. Parizi LF, Githaka NW, Acevedo C, Benavides U, Seixas A, Logullo C, Konnai S,
2 534 Ohashi K, Masuda A, Vaz ID: **Sequence characterization and**
3 535 **immunogenicity of cystatins from the cattle tick *Rhipicephalus***
4 536 **(*Boophilus*) *microplus*. *Ticks Tick Borne Dis* 2013, **4**(6):492-499.**
- 5
6
7 537 23. Robbins RG: **The ticks (Acari : Ixodida : Argasidae, Ixodidae) of Taiwan: A**
8 538 **synonymic checklist. *Proc Entomol Soc Wash* 2005, **107**(2):245-253.**
- 9
10 539 24. Chen Z, Yang XJ, Bu FJ, Yang XH, Yang XL, Liu JZ: **Ticks (Acari: Ixodoidea:**
11 540 **Argasidae, Ixodidae) of China. *Exp Appl Acarol* 2010, **51**(4):393-404.**
- 12
13
14 541 25. Estrada-Pena A, Jongejan F: **Ticks feeding on humans: a review of records on**
15 542 **human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission.**
16 543 ***Exp Appl Acarol* 1999, **23**(9):685-715.**
- 17
18
19 544 26. Murase Y, Konnai S, Githaka N, Hidano A, Taylor K, Ito T, Takano A, Ando S,
20 545 Kawabata H, Tsubota T, Murata S, Ohashi K: **Prevalence of Lyme *Borrelia***
21 546 **in *Ixodes persulcatus* Ticks from an area with a confirmed case of Lyme**
22 547 **disease. *J Vet Med Sci* 2013, **75**(2):215-218.**
- 23
24
25 548 27. Chao LL, Liu LL, Ho TY, Shih CM: **First detection and molecular identification**
26 549 **of *Borrelia garinii* Spirochete from *Ixodes ovatus* tick ectoparasitized on**
27 550 **stray cat in Taiwan. *Plos One* 2014, **9**(10).**
- 28
29 551 28. Takahashi Y, Sohnaka M, Nakao M, Miyamoto K, Fukunaga M: **Characterization**
30 552 **of *Borrelia* species isolated from Ixodid ticks, *Ixodes ovatus*. *Microbiol***
31 553 ***Immunol* 1993, **37**(9):721-727.**
- 32
33
34 554 29. Abbas RZ, Zaman MA, Colwell DD, Gilleard J, Iqbal Z: **Acaricide resistance in**
35 555 **cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Vet***
36 556 ***Parasitol* 2014, **203**(1-2):6-20.**
- 37
38
39 557 30. Merino O, Alberdi P, Pérez de la Lastra JM, de la Fuente J: **Tick vaccines and the**
40 558 **control of tick-borne pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 2013, **3**(30).**
- 41
42 559 31. Parizi LF, Githaka NW, Logullo C, Konnai S, Masuda A, Ohashi K, Vaz ID: **The**
43 560 **quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. *Vet J***
44 561 **2012, **194**(2):158-165.**
- 45
46
47 562 32. Nijhof AM, Balk JA, Postigo M, Rhebergen AM, Taoufik A, Jongejan F: **Bm86**
48 563 **homologues and novel ATAQ proteins with multiple epidermal growth**
49 564 **factor (EGF)-like domains from hard and soft ticks. *Int J Parasitol* 2010,**
50 565 ****40**(14):1587-1597.**
- 51
52
53 566 33. Agianian B, Tucker PA, Schouten A, Leonard K, Bullard B, Gros P: **Structure of a**
54 567 ***Drosophila sigma* class glutathione S-transferase reveals a novel active**
55 568 **site topography suited for lipid peroxidation products. *J of Mol Biol* 2003,**
56 569 ****326**(1):151-165.**
- 57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 570 34. Hajdusek O, Sojka D, Kopacek P, Buresova V, Franta Z, Sauman I, Winzerling J,
2 571 Grubhoffer L: **Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits**
3 572 **tick reproduction and development.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009,
4 573 **106(4):1033-1038.**
- 5
6
7 574 35. Havlikova S, Roller L, Koci J, Trimnell AR, Kazimirova M, Klempa B, Nuttall PA:
8 575 **Functional role of 64P, the candidate transmission-blocking vaccine**
9 576 **antigen from the tick, *Rhipicephalus appendiculatus*.** *Int J Parasitol* 2009,
10 577 **39(13):1485-1494.**
- 11
12
13 578 36. Galindo RC, Doncel-Perez E, Zivkovic Z, Naranjo V, Gortazar C, Mangold AJ,
14 579 Martin-Hernando MP, Kocan KM, de la Fuente J: **Tick subolesin is an**
15 580 **ortholog of the akirins described in insects and vertebrates.** *Dev Comp*
16 581 *Immunol* 2009, **33(4):612-617.**
- 17
18
19 582 37. Kotsyfakis M, Anderson JM, Andersen JF, Calvo E, Francischetti IMB, Mather TN,
20 583 Valenzuela JG, Ribeiro JMC: **Cutting edge: Immunity against a "Silent"**
21 584 **salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to**
22 585 **feed.** *J Immunol* 2008, **181(8):5209-5212.**
- 23
24
25 586 38. Gonsioroski AV, Bezerra IA, Utiumi KU, Driemeier D, Farias SE, Vaz ID, Masuda
26 587 A: **Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding**
27 588 **in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females.** *Exp Parasitol* 2012,
28 589 **130(4):359-363.**
- 29
30
31 590 39. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and**
32 591 **analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl Acids Symp Ser* 1999,
33 592 **41:95-98.**
- 34
35 593 40. Wolf H, Modrow S, Motz M, Jameson BA, Hermann G, Fortsch B: **An Integrated**
36 594 **Family of Amino Acid Sequence Analysis Programs.** *Comput Appl Biosci*
37 595 1988, **4(1):187-191.**
- 38
39
40 596 41. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5:**
41 597 **Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood,**
42 598 **Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** *Mol Biol Evol*
43 599 2011, **28(10):2731-2739.**
- 44
45
46 600 42. Hirata IY, Cezari MHS, Nakaie CR, Boschcov P, Ito AS, Juliano MA, Juliano L:
47 601 **Internally quenched luorogenic protease substrates: solid-phase synthesis**
48 602 **and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-**
49 603 **aminobenzoyl-dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs.** *Lett Pept Sci*
50 604 1994, **1: 299-308.**
- 51
52
53 605 43. Korkmaz B, Attucci S, Juliano MA, Kalupov T, Jourdan ML, Juliano L, Gauthier F:
54 606 **Measuring elastase, proteinase 3 and cathepsin G activities at the surface**
55 607 **of human neutrophils with fluorescence resonance energy transfer**
56 608 **substrates.** *Nat Protoc* 2008, **3(6):991-1000.**
- 57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 609 44. Vaz ID, Logullo C, Sorgine M, Velloso FF, de Lima MFR, Gonzales JC, Masuda H,
2 610 Oliveira PL, Masuda A: **Immunization of bovines with an aspartic**
3 611 **proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs.** *Vet Immunol*
4 612 *Immunopathol* 1998, **66**(3-4):331-341.
- 5
6
7 613 45. Tirloni L, Reck J, Terra RMS, Martins JR, Mulenga A, Sherman NE, Fox JW, Yates
8 614 JR, Termignoni C, Pinto AFM, Vaz ID: **Proteomic analysis of cattle tick**
9 615 ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: A comparison between**
10 616 **partially and fully engorged females.** *Plos One* 2014, **9**(4).
- 11
12
13 617 46. Vaz ID, Imamura S, Ohashi K, Onuma M: **Cloning, expression and partial**
14 618 **characterization of a *Haemaphysalis longicornis* and a *Rhipicephalus***
15 619 ***appendiculatus* glutathione S-transferase.** *Insect Mol Biol* 2004, **13**(3):329-
16 620 335.
- 17
18
19 621 47. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during assembly of head of**
20 622 **Bacteriophage-T4.** *Nature* 1970, **227**(5259):680-685.
- 21
22 623 48. Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH: **Improved technique utilizing**
23 624 **nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to**
24 625 **nitrocellulose.** *Gene Anal Tech* 1984, **1**(1):3-8.
- 25
26
27 626 49. Hartmann S, Lucius R: **Modulation of host immune responses by nematode**
28 627 **cystatins.** *Int J Parasitol* 2003, **33**(11):1291-1302.
- 29
30
31 628 50. Lima CA, Sasaki SD, Tanaka AS: **Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor**
32 629 **characterized from the tick *Boophilus microplus*.** *Biochem Biophys Res*
33 630 *Commun* 2006, **347**(1):44-50.
- 34
35 631 51. Horn M, Nussbaumerova M, Sanda M, Kovarova Z, Srba J, Franta Z, Sojka D,
36 632 Bogyo M, Caffrey CR, Kopacek P, Mares M: **Hemoglobin digestion in**
37 633 **blood-feeding ticks: Mapping a multi-peptidase pathway by functional**
38 634 **proteomics.** *Chem Biol* 2009, **16**(10):1053-1063.
- 39
40
41 635 52. Franta Z, Frantova H, Konvickova J, Horn M, Sojka D, Mares M, Kopacek P:
42 636 **Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the**
43 637 **hard tick *Ixodes ricinus*.** *Parasit Vectors* 2010, 3119.
- 44
45
46 638 53. Sojka D, Franta Z, Horn M, Caffrey CR, Mares M, Kopacek P: **New insights into**
47 639 **the machinery of blood digestion by ticks.** *Trends Parasitol* 2013,
48 640 **29**(6):276-285.
- 49
50
51 641 54. Seixas A, Dos Santos PC, Velloso FF, Vaz ID, Masuda A, Horn F, Termignoni C: **A**
52 642 ***Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase.**
53 643 *Parasitology* 2003, **126**:155-163.
- 54
55 644 55. Pohl PC, Sorgine MHF, Leal AT, Logullo C, Oliveira PL, Vaz ID, Masuda A: **An**
56 645 **extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-**
57 646 **degradation activity.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008,
58 647 **151**(4):392-399.
- 59
60
61
62
63
64
65

- 1 648 56. Galay RL, Aung KM, Umemiya-Shirafuji R, Maeda H, Matsuo T, Kawaguchi H,
2 649 Miyoshi N, Suzuki H, Xuan XN, Mochizuki M, Fujisaki K, Tanaka T:
3 650 **Multiple ferritins are vital to successful blood feeding and reproduction**
4 651 **of the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Exp Biol* 2013, **216**(10):1905-**
5 652 **1915.**
6
7
8 653 57. Kotsyfakis M, Horka H, Salat J, Andersen JF: **The crystal structures of two**
9 654 **salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these**
10 655 **inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a**
11 656 **murine model. *Mol Microbiol* 2010, **77**(2):456-470.**
12
13
14 657 58. Hsing LC, Rudensky AY: **The lysosomal cysteine proteases in MHC class II**
15 658 **antigen presentation. *Immunol Rev* 2005, **207**:229-241.**
16
17
18 659 59. Serveau-Avesque C, Ferrer-Di Martino M, Herve-Grepinet V, Hazouard E, Gauthier
19 660 F, Diot E, Lalmanach G: **Active cathepsins B, HK, L and S in human**
20 661 **inflammatory broncho-alveolar lavage fluids. *Biol Cell* 2006, **98**(1):15-22.**
21
22
23 662 60. Parizi LF, Rech H, Ferreira CAS, Imamura S, Ohashi K, Onuma M, Masuda A, Vaz
24 663 ID: **Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and**
25 664 ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus calreticulins. *Vet Parasitol* 2009,***
26 665 **164(2-4):282-290.**
27
28 666 61. Parizi LF, Utiumi KU, Imamura S, Onuma M, Ohashi K, Masuda A, Vaz ID: **Cross**
29 667 **immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase**
30 668 **reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation.**
31 669 ***Exp Parasitol* 2011, **127**(1):113-118.**
32
33
34 670 62. Sirima SB, Tiono AB, Ouedraogo A, Diarra A, Ouedraogo AL, Yaro JB, Ouedraogo
35 671 E, Gansane A, Bougouma EC, Konate AT, Kabore Y, Traore A, Roma C,
36 672 Soulama I, Luty AJF, Cousens S, Nebie I: **Safety and Immunogenicity of**
37 673 **the Malaria Vaccine Candidate MSP3 Long Synthetic Peptide in 12-24**
38 674 **Months-Old Burkinabe Children. *Plos One* 2009, **4**(10).**
39
40
41 675 63. El-Awady MK, Tabll AA, El-Abd YS, Yousif H, Hegab M, Reda M, El Shenawy R,
42 676 Moustafa RI, Degheidy N, El Din NGB: **Conserved peptides within the E2**
43 677 **region of Hepatitis C virus induce humoral and cellular responses in**
44 678 **goats. *Virol J* 2009, **6**(66).**
45
46
47 679 64. El-Awady MK, Tabll AA, Yousif H, El-Abd Y, Reda M, Khalil SB, El-Zayadi AR,
48 680 Shaker MH, El Din NGB: **Murine neutralizing antibody response and**
49 681 **toxicity to synthetic peptides derived from E1 and E2 proteins of**
50 682 **hepatitis C virus. *Vaccine* 2010, **28**(52):8338-8344.**
51
52
53 683 65. Tang H, Liu X, Fang Y, Jiang S, Pan L, Lv J, Zhang Z, Zhou P, Zhang Y, Wang Y:
54 684 **Evaluation of synthetic peptide vaccines against foot-and-mouth disease**
55 685 **type A. *Appl Microbiol Biotechnol*, in press.**
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

66. van Poelgeest MIE, Welters MJP, van Esch EMG, Stynenbosch LFM, Kerpershoek G, van Meerten ELV, van den Hende M, Lowik MJG, Berends-van der Meer DMA, Fathers LM, Valentijn ARPM, Oostendorp J, Fleuren GJ, Melief CJM, Kenter GG, van der Burg SH: **HPV16 synthetic long peptide (HPV16-SLP) vaccination therapy of patients with advanced or recurrent HPV16-induced gynecological carcinoma, a phase II trial.** *J Transl Med* 2013, **11**(88).
67. Wang Y, Wang G, Ou J, Yin H, Zhang D. **Analyzing and identifying novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA4.** *Parasit Vectors* 2014, **7**(1):474.
68. Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Pimentel JC, Guzman F, Patarroyo ME, Vargas MI, Prates AA, Mendes MAD: **Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86).** *Vet Immunol Immunopathol* 2002, **88**(3-4):163-172.

Legends

Figure 1 JpIocys2a nucleotide and predicated amino acid sequences. The predicated signal peptide (SignalP) is underlined. Cysteine residues are in gray and the conserved cystatin motifs PI (G), P II (QxVxG), and P III (PW) are boxed.

Figure 2 Conserved and antigenic tick cystatin regions for JpIocys2a peptide selection. Antigenic index plots for tick cystatins were predicted using the Jameson–Wolf algorithm. Graphic increased positivity shows predictive antigenic sites. Alignment shows conserved regions between JpIocys2a and *R. microplus* cystatins. Black boxes indicate conserved and antigenic amino acid region for each sequence. Asterisk indicate the selected region for peptide synthesis.

Figure 3 SDS-PAGE and Western blot of rJpIocys2a, rBrBmcys2b and rBrBmcys2c production. Western blot: purified rGST-JpIocys2a probed with anti-GST-HI primary antibody and rabbit anti-IgG secondary antibody conjugate with alkaline phosphatase; purified rBrBmcys2b and rBrBmcys2c probed with anti-histidine tag primary antibody conjugate with alkaline phosphatase. Alkaline phosphatase revelations were performed with NBT and BCIP. SDS-PAGE: Recombinant cystatins resolved by 14% SDS-PAGE were stained with Coomassie blue G-250; purified rGST-JpIocys2a before and after thrombin cleavage (rGST and JpIocys2a); purified rJpIocys2a, rBrBmcys2b and rBrBmcys2c. MW: molecular weight.

Figure 4 Activity inhibition assay of cathepsins B, C, and L by rJpIocys2a, rBrBmcys2b, and rBrBmcys2c. Cathepsins B, C, and L were incubated with Z-Arg-Arg-pNA (0.125 mM), Gly-Phe-pNA (1.8 mM), or Z-Phe-Arg-MCA (0.02 mM), respectively, in the presence of different concentrations of rJpIocys2a, rBrBmcys2b, and rBrBmcys2c. The abscissa shows inhibitors concentration (nM, log₁₀); the ordinate shows percentage of remaining enzymatic activity. Incubation of cathepsins B, C, and L without rJpIocys2a, rBrBmcys2b, and rBrBmcys2c represents 100% of enzyme activity.

Figure 5 Cross-immunogenicity between native and recombinant tick cystatins. By Western blot, *R. microplus* and *I. ovatus* recombinant cystatins or *R. microplus* tissue

1 728 extracts were analyzed using sera (1:50) against: **A)** rBrBmcys2b; **B)** rBrBmcys2c **C)**
2 729 STQpep.SG, salivary glands; OV, ovary; FB, fatty body, S, saliva; H, hemolymph; L,
3 730 larva; SGp, salivary glands from partially engorged female; SGt, salivary glands from fully
4 731 engorged female; C2b, rBrBmcys2b; C2c, rBrBmcys2c; C1o, rJpIocys2a. MW: molecular
5 732 weight. Anti-IgG alkaline phosphatase rabbit sera and peroxidase hamster sera conjugates
6 733 were used as secondary antibodies. Alkaline phosphatase revelations were performed with
7 734 NBT and BCIP. Peroxidase revelations were performed with DAB, H₂O₂ and CoCl₂.
8
9
10 735 **Figure 6 Phylogenetic analysis of tick cystatins.** *R. microplus* BrBmcys2b [GenBank:
11 736 KC816580], *R. microplus* BrBmcys2c [GenBank: KC816581], *R. microplus* Rmcystatin-3
12 737 [GenBank: AIX97454]; *I. ovatus* JpIocys2a [GenBank: KP253747]; *I. scapularis*
13 738 sialostatin 1 [GenBank: AF483724], *I. scapularis* sialostatin 2 [GenBank: DQ066048]; *H.*
14 739 *longicornis* Hlcyst-2 [GenBank: DQ364159], *H. longicornis* Hlcyst-3 [GenBank:
15 740 EU426545]. Bootstrap values of 1,000 simulations are shown at the branches.

17
18 741
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

742 Table 1

743 Cystatins dissociation constants (KIs) for different proteases

Enzyme	Family	Enzyme concentration	Ki (nM)		
			rBrBmcys2b	rBrBmcys2c	JpIpcys2a
Cathepsin B ¹	Cysteine protease	0.500 μM	0.82 ± 0.35	n.i.	154.70 ± 106.71
Cathepsin C ¹	Cysteine protease	0.160 μM	26.65 ± 6.75	0.45 ± 0.12	> 1 μM
Cathepsin L ²	Cysteine protease	0.043 μM	2.48 ± 1.00	28.45 ± 2.34	4.39 ± 1.76
Cathepsin G ²	Serine protease	0.100 μM	n.i	n.i.	n.i.

744 n.i., not inhibited in the presence of 0.5 μM recombinant cystatin;

745 ¹Bovine cathepsin;

746 ²Human cathepsin.

747

Figure 1

[Click here to download Figure: Figure 1.pdf](#)

ATGGCTTTCTTCAAGGTTGCCGTATTCCTGGTTTGTGTGGTCCTCGCAGCGGCCGGGTCTG
M A F F K V A V F L V C V V L A A A G S
GCGAGCAGGTCAAAGAGGGCCCTGGTCGGAGGCTGGAAGACGCAGGACCCAACCAACCCC
A S R S K R A L V **G** G W K T Q D P T N P
AAGTTCGAGAATCTGGCGCACTACGCAGTGTCTACCCAAGTCGAAGGTCGAGAATACTAC
K F E N L A H Y A V S T Q V E G R E Y Y
GACACGGTCCTCGAGCTCTTGGAGGTGCAGACTCAGATTGTGGCCGGCGTGA ACTACAAG
D T V L E L L E V Q T **Q I V A G** V N Y K
TTGAAGTTTACAACGACTCAATCGACGTGCAAGATCGAAACCGGCGTGAATACTCCAAG
L K F T T T Q S T C K I E T G V E Y S K
GAGCTTTGCCAGCCTAAGACAAACAAGGTTCAATCTGTATGCACCGCAATCATCTACACA
E L C Q P K T N K V Q S V C T A I I Y T
GTTCCATGGCAGAACATCAAGCGGGTTTTGTCTACCCTGCGAAGCTCCTAATAATGTC
V **P W** Q N I K R V L S Y H C E A P N N V
TAG
*

Figure 3

[Click here to download high resolution image](#)

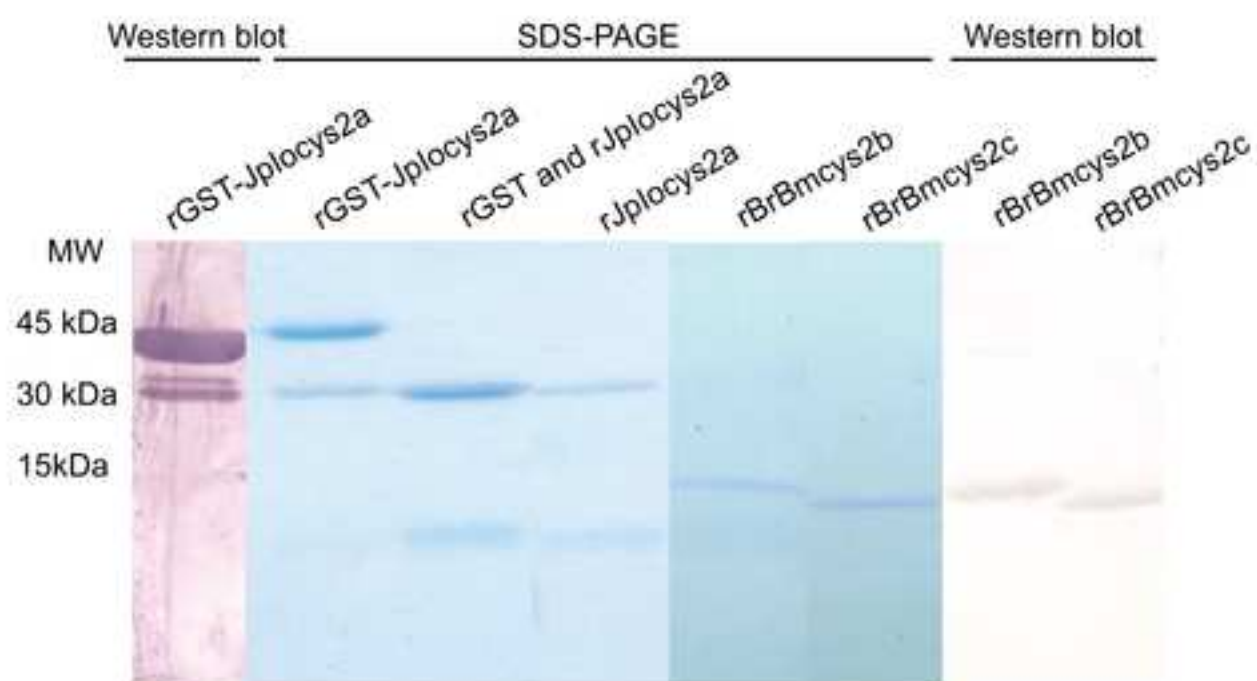


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

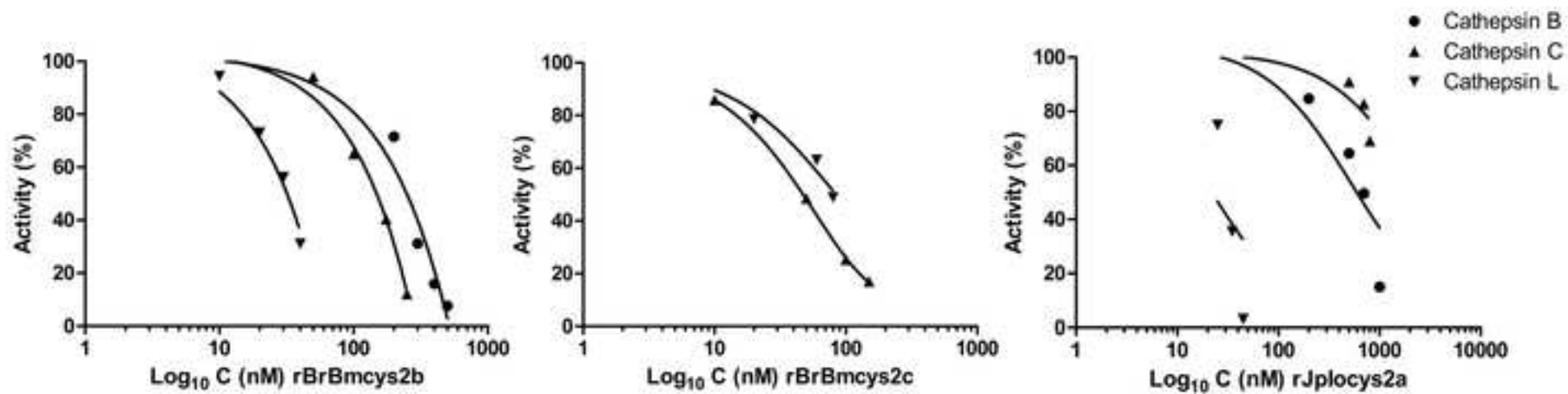


Figure 5

[Click here to download high resolution image](#)

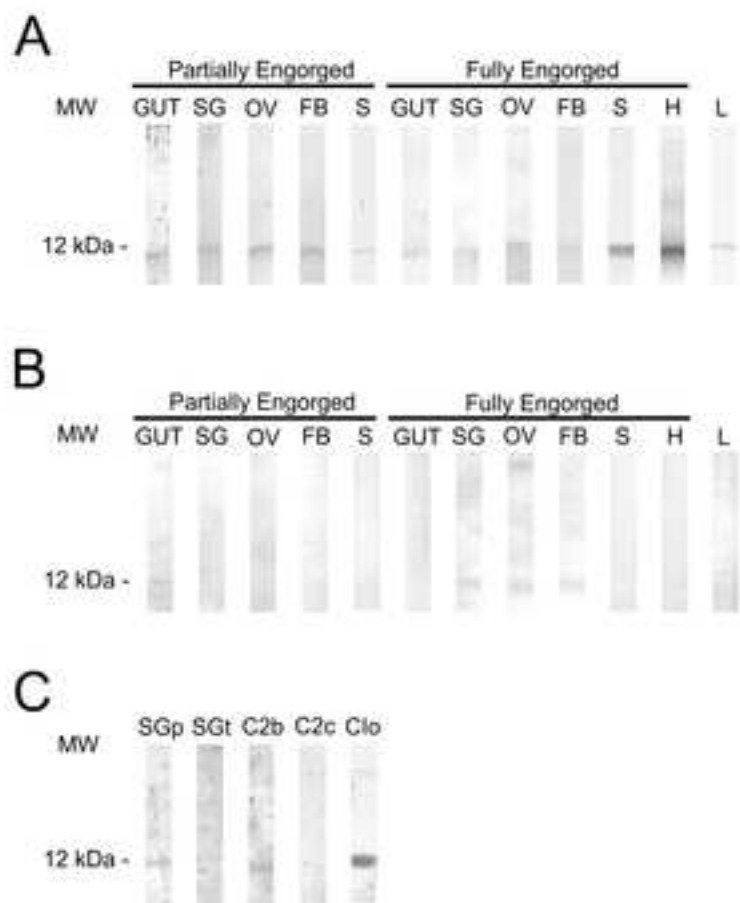
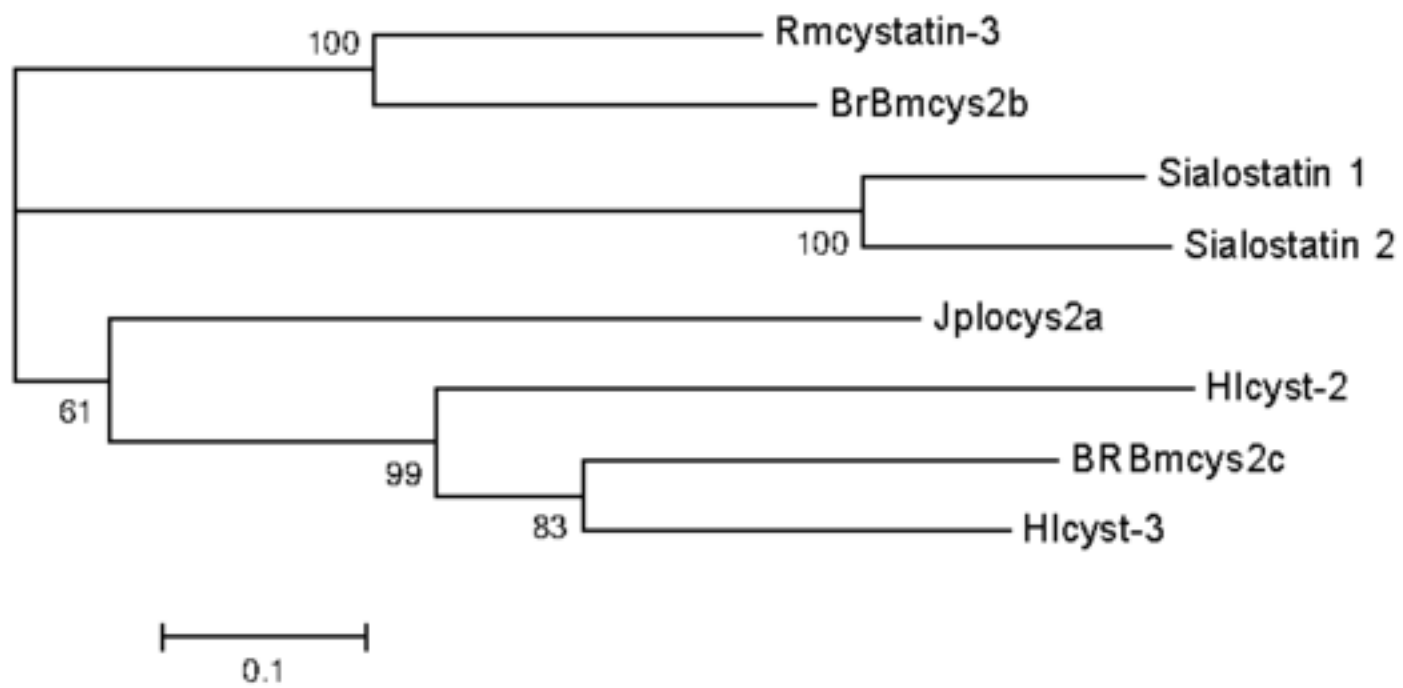


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)



8. CURRÍCULO RESUMIDO DO AUTOR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Gabriela Alves Sabadin

Local e data de nascimento: Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil – 30/12/1990

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 4321, bairro Agronomia

Telefone profissional: (51) 3308-6078

E-mail: gabrielasabadin@hotmail.com

2. FORMAÇÃO:

Graduação em Biotecnologia bacharelado pela Universidade Federal de Pelotas.

3. ESTÁGIOS:

2010-2012: Bolsista de Iniciação Científica CAPES, no Laboratório de Imunologia Aplicada, sob orientação do professor Fabricio R. Conceição. Neste período foram desenvolvidas atividades relacionadas a utilização da levedura *Pichia pastoris* como probiótico.

4. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

FRANÇA, R.; HAUBERT, L.; **SABADIN, G. A.**; CONCEIÇÃO, F. R.; SILVA, W.P. Resistência da levedura *Pichia pastoris* ao armazenamento em solução sob refrigeração e ao trato gastrointestinal de camundongos. In: Congresso de Iniciação Científica, 2010, Pelotas. XIX CIC Resumos, 2010.

FRANÇA, R.; **SABADIN, G. A.**; HAUBERT, L.; SILVA, W.P.; BAMPI, S. R.; MAGALHÃES, C.; SILVEIRA, M.M.; CASTELLI, R.; CONCEIÇÃO, F.R. Inibição do crescimento in vitro de *Salmonella typhimurium* por *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi. In: 20º Congresso de Iniciação Científica, 10ª Mostra de Pós-Graduação e 3º Congresso de Extensão, 2011

HAUBERT, L.; FRANÇA, R.; **SABADIN, G. A.**; CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N. Resistência da levedura *Pichia pastoris* ao armazenamento em suspensão aquosa sob refrigeração e na forma liofilizada. In: 26º Congresso Brasileiro De Microbiologia, 2011.

HAUBERT, L.; FRANÇA, R.; **SABADIN, G. A.**; CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N. Avaliação da inocuidade de *pichia pastoris* para potencial utilização como probiótico. In: 26º Congresso Brasileiro De Microbiologia, 2011.

SABADIN, G. A.; PARIZI, L. F.; GITHAKA, N. W.; SEIXAS, A.; OLIVEIRA, C. J. L.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; VAZ JR, I. S. Analysis of Cystatin Sequences and Prediction of Cross-Antigenic Regions for a Tick Vaccine. In: Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica (SBBq), 2013.

BARCELLOS, M.S.; MATTIA, M. M. C.; FYRPO, R. M; TIRLONI, L.; **SABADIN, G. A**; DA SILVA VAZ JR., I.; SEIXAS, A. Expressão e purificação de RMS-3, uma serpina de *Rhipicephalus microplus*. In: XVIII Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária, 2014.

ALZUGARAY, M.F.; **SABADIN, G. A.**; ACEVEDO, C.; PARIZI, L.F.; TIRLONI L.; SEIXAS, A.; BERASAIN, P.; BENAVIDES, U.; DA SILVA VAZ JR, I. Sequence analysis, transcriptional profile and vaccine potential of the *Rhipicephalus microplus* protein Bm05. In: XVIII Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária, 2014.

PARIZI, L. F.; **SABADIN, G. A.**; ALZUGARAY, M.F.; SEIXAS, A.; LOGULLO, C.; KONNAI, S; OHASHI, K.; MASUDA, A; DA SILVA VAZ JR., I. The putative physiological roles of two *Rhipicephalus microplus* cystatin. In: XVIII Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária, 2014.

SABADIN, G. A.; PARIZI, L. F.; GITHAKA, N.W.; SEIXAS, A.; LOGULLO, C.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; DA SILVAVAZ JR, I. Sequence analysis, antigenicity and production of *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ovatus*, *Rhipicephalus appendiculatus* cystatins In: XVIII Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária, 2014.