

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

METALOPROTEASES DE CARRAPATO: PERSPECTIVA DE ANTÍGENO
PARA VACINA

ABID ALI

Porto Alegre, Fevereiro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**METALOPROTEASES DE CARRAPATO: PERSPECTIVA DE ANTÍGENO
PARA VACINA**

ABID ALI

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Carlos Termignoni

Porto Alegre, Fevereiro de 2014

INSTITUIÇÕES 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.

The World Academy of Sciences for the Advancement of Science in Developing Countries (TWAS).

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.

ÍNDICE

Resumo.....	6
Summary	7
1. Introdução	8
1.1. Ciclo de vida do <i>R.microplus</i> , <i>R. sanguineus</i> e <i>I. persulcatus</i>	11
1.1.1. <i>R. microplus</i>	12
1.1.2. <i>R. sanguineus</i>	13
1.1.3. <i>I. persulcatus</i>	15
1.2. Vacinas anti-carrapato.....	16
1.3. Significância do genes conservados.....	19
1.4. Metaloproteases.....	20
1.5. Mecanismo de ação das MPs	21
1.6. Papel de MPs na hematofagia e patologia.....	24
1.7. MPs de artrópodes.....	26
1.8. MPs de carrapatos	27
1.9. MPs de <i>I. scapularis</i>	28
1.10. MPs de <i>I. ricinus</i>	30
1.11. MPs de <i>H. longicornis</i>	31
1.12. MPs de <i>R. microplus</i>	32
1.13. Inibidores de MPs de carrapato.....	32
1.13. MPs em estudos de “sialotranscriptômica e mialômica” de carrapato	33
2. Objetivo geral.....	35
2.1. Objetivos específicos	35
3. Capítulo 1	36
Artigo 1.....	36

4.	Capitulo 2	57
	Artigo 2.	57
5.	Discussão	82
6.	Conclusão e perspectivas	92
7.	Referências	93
8.	Curriculum Vitae.....	115

Resumo

As metaloproteases (MPs) são proteínas que participam em diversos processos fisiológicos e patológicos. Neste trabalho, relatamos a identificação de MPs em três carrapatos de importância econômica: *Ixodes persulcatus* (Ip-MPs), *Rhipicephalus sanguineus* (Rs-MPs) e *Rhipicephalus microplus* (BrRm-MPs). O perfil transcricional em vários tecidos e fases de vida mostra que MPs são transcritas em glândula salivar durante a alimentação de fêmeas e não são transcritos no macho (com exceção de uma MP, BrRm-MP4) e ovos, o que sugere que esta família de proteínas são componentes funcionais necessários para interferir nas defesas do hospedeiro, apoiando o processo de hematofagia. A presença de um sítio de ligação de zinco, uma dobra “Met-turn” e um domínio rico em cisteína na região C-terminal indica que todas os transcritos obtidos codificam para a família de MPs reoplisina (metzincina). Uma das MPs de *R. microplus* (BrRm-MP4) foi selecionada para uma investigação mais aprofundada quanto ao potencial como um antígeno vacinal, devido ao seu padrão de transcrição ubíquos e devido à previsão *in silico* de epítomos imunogênicos, em comparação com as demais MPs identificadas. BrRm-MP4 recombinante (rBrRm-MP4) foi expressa em *Escherichia coli* e testadas como um antígeno contra infestação de *R. microplus*. Imunoblot mostrou que o soro de bovinos imunizados com rBrRm-MP4 reconhece BrRm-MP4 da glândula salivar, ovário e larvas de *R. microplus*. Comparando com o controle, a vacinação com rBrRm-MP4 proporcionou uma redução de 43% no número de fêmeas adultas, redução de 14,80% na postura de ovos e redução de 17,53 % na capacidade de eclosão da larva, realizando um proteção total de 60% estatisticamente significativa. Os resultados indicam que rBrRm-MP4 é um potencial candidato a ser incluído como imunógeno em uma vacina anti-carrapato.

Summary

Metalloproteases (MPs) are proteins participating in several physiological and pathological processes. Here, we report the identification of MPs in three economically important ticks: *Ixodes persulcatus* (Ip-MPs), *Rhipicephalus sanguineus* (Rs-MPs) and *Rhipicephalus microplus* (BrRm-MPs). Transcriptional profile in various tissues and life stages revealed the presence of all MPs transcripts in salivary glands during feeding stages and absence in males (except one MP, BrRm-MP4) and eggs, suggesting this family proteins are functional components required to interfere with host defenses, supporting tick hematophagy. The presence of a zinc binding site, a “Met-turn” and C-terminal cysteine rich domain indicates all obtained transcripts encode for proteins belonging to the repropylsin (metzincin) family of MPs. A *R. microplus* MP (BrRm-MP4) was selected for further investigation concerning its potential as a vaccinal antigen due to its ubiquitous transcription pattern and *in silico* prediction of immunogenic epitopes, comparing to other obtained MPs. Recombinant BrRm-MP4 (rBrRm-MP4) was expressed in *Escherichia coli* and tested as an immune-protective antigen against *R. microplus* infestation. Immunoblot showed specific antibodies against rBrRm-MP4 in immunized calves sera. Sera from immunized calves recognized BrRm-MP4 in *R. microplus* salivary gland, ovary and larvae. Comparing to ticks reared non-vaccinated calves, rBrRm-MP4 provided 43% reduction in adult female number, 14.80% reduction in egg laying and 17.53% reduction in larva hatching capacity, performing an overall 60% statistically significant protection. We assume rBrRm-MP4 is a potential candidate to be included as immunogen for further development in an anti-tick vaccine.

1. Introdução

O risco à saúde humana e animal por infecções transmitidas por carrapatos tem atraído atenção dos setores médicos e veterinários. Carrapatos, além dos prejuízos causados pela espoliação de sangue e anemia são vetores de vírus, fungos e bactérias patogênicos (HAJDUSEK *et al.*, 2013). Estes ectoparasitas hematófagos são ácaros pertencentes a duas famílias principais, Argasidae (carrapato mole) e Ixodidae (carrapato duro) e uma terceira família, formada por uma única espécie que possui características de carrapato duro e mole (Nuttalliellidae). A família Argasidae possui 193 espécies de carrapatos distribuídos em quatro gênero diferentes, enquanto a família Ixodidae possui 702 espécies distribuídas em 14 gêneros (HORAK *et al.*, 2002; GUGLIELMONE *et al.*, 2010). Carrapatos argasídeos realizam o repasto sanguíneo rapidamente, alimentando-se de pequenas quantidades de sangue diversas vezes, ao contrário dos ixodídeos, que permanecem fixados aos hospedeiros ingerindo grandes quantidades de sangue por vários dias. Carrapatos ixodídeos são únicos entre os ectoparasitos, devido principalmente ao longo tempo que passam fixados ao hospedeiro (SAUER *et al.*, 2000).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um parasita monotrópico monóxeno endêmico entre os paralelos 32 °N e 32 °S (SOSSAI *et al.*, 2005), área que abrange os principais países produtores de carne bovina (Fig. 1). Além da transmissão de *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. este carrapato causa perdas pela espoliação do hospedeiro bovino, levando a menor produção de carne e leite, pela maior propensão a miíses e danos ao couro. Em 1992, as perdas econômicas globais causadas por *R. microplus* foram estimadas em US\$ 8 bilhões (RECHAV, 1992). No Brasil, um dos maiores rebanho bovino

no mundo e também um dos maiores exportadores de carne bovina, as perdas causadas pelo *R. microplus* são estimadas em 3,9 US\$ bilhões em 2013 (GRISI *et al.*, 2013).



Fig.1. Distribuição geográfica de *R. microplus* (em preto), incluindo a incidência recente no Oeste da África (círculo) (MADDER *et al.*, 2007; LEGER *et al.*, 2013).

Diferentemente, o carrapato *Ixodes persulcatus*, também conhecido como *Taiga tick*, é um carrapato que possui três hospedeiros e é endêmico na zona da *Taiga* (Fig. 2) (Extremo Oriente da Ásia, Japão, Rússia, norte da China, Mongólia e Cazaquistão) (KOVALEV & MUKHACHEVA., 2012). Ele tem sido associado com a transmissão de vários patógenos, como o vírus da encefalite transmitida por carrapato, *Borrelia burgdorferis* e *Anaplasma phagocytophilum*, para seus hospedeiros que são em sua maioria pequenos mamíferos ungulados e ocasionalmente pássaros (KANG & JANG, 1985; HAYASAKA *et al.*, 2001; SHPYNOV *et al.*, 2004; WURITU *et al.*, 2009; KONNAI *et al.*, 2011).



Fig.2. Distribuição geográfica de *I. persulcatus* (em cinza) (KOVALEV & MUKHACHEVA., 2012).

Rhipicephalus sanguineus é um carrapato de três hospedeiros que se alimenta principalmente no cão e ocasionalmente em outros hospedeiros, incluindo bovinos, humanos e chacais (GHOSH *et al.*, 2007; DANTAS-TORRES, 2009). Esta amplamente distribuído (50 °N e 35 °S) (Fig. 3) e é vetor de diversos patógenos para cães, como *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii* (BRUMPT, 1932; DANTAS-TORRES, 2008; PACHECO *et al.*, 2011), além de *R. conorii* e *R. rickettsii*, agentes da febre maculosa humana do Mediterrâneo (*Mediterranean spotted fever*), febre maculosa brasileira e febre das Montanhas Rochosas (*Rocky Mountain fever*) (MORAES-FILHO *et al.*, 2009; DANTAS-TORRES *et al.*, 2012).

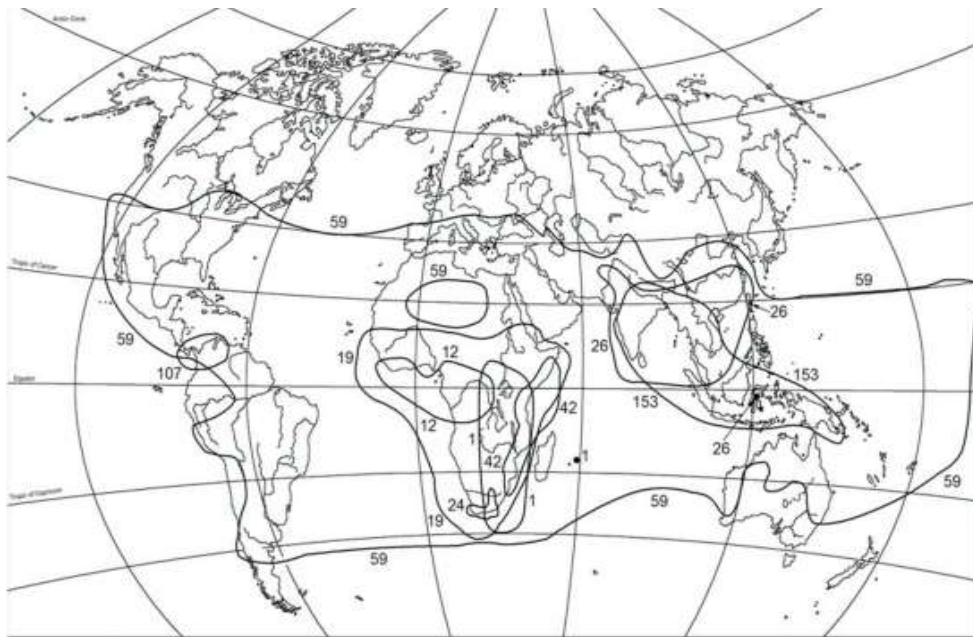


Fig.3. Os círculos mostram a distribuição de geográfica de *R. sanguineus* (KOLONIN, 2009).

1.1. Ciclo de vida do *R. microplus*, *R. sanguineus* e *I. persulcatus*

A maioria dos carrapatos passa por quatro estágios de vida: ovo, larva (com três pares de patas), ninfa (quatro pares de patas) e adultos. Após a eclosão dos ovos, os carrapatos procuram por um hospedeiro, onde se alimentam de sangue. Algumas espécies de carrapato exigem vários hospedeiros e podem demorar até três anos para completar seu ciclo de vida, sendo que maioria dos carrapatos morre por não encontrar um hospedeiro para a próxima alimentação (Centers for Disease Control and Prevention, http://www.cdc.gov/ticks/life_cycle_and_hosts.html).

1.1.1. *R. microplus*

Os carrapatos pertencentes ao subgênero *Boophilus* têm um ciclo de vida (Fig. 4) parasitária de três a quatro semanas, produzindo grande infestação nos hospedeiros. *R. microplus* passa por todas as fases de vida parasitária (cerca de 21 dias) em um único hospedeiro. Depois de se alimentarem, as fêmeas adultas despreendem-se do hospedeiro e abrigam-se no solo junto às partes inferiores da vegetação para postura de ovos, com um período de pré-postura de 2-3 dias (ROCHA, 1998). Após a postura de um único lote de dois a três mil ovos a fêmea morre. Em condições ideais (temperatura, umidade, abrigo da luz direta), a incubação dos ovos leva de 12 a 15 dias. Em seguida, as larvas levam cerca de 7 dias movimentando-se, e também levadas pelo vento, até que encontrem um hospedeiro (GONZALES, 1995). As larvas abrigam-se sob a vegetação e sobem para as pontas das pastagens quando estimuladas por sinais do hospedeiro, sendo CO₂ o principal deles. Caso não consigam um hospedeiro, retornam ao abrigo para se reidratarem e aguardarem por um novo hospedeiro. Uma vez no hospedeiro, procuram um local onde a pele seja menos espessa, onde se fixam pelo aparelho bucal e iniciam um repasto inicialmente de linfa e logo em seguida de sangue (WAGLAND, 1978; CORDOVÉS, 1997). No verão, *R. microplus* pode sobreviver por três a quatro meses sem se alimentar, enquanto no inverno, esse período pode se prolongar por seis ou até mais meses. As larvas sofrem duas mudas, para tornarem-se ninfas e depois adultos. Durante todo tempo de vida parasitária (de larva ao adulto totalmente ingurgitado) as fêmeas permanecem com o aparelho bucal fixado ao hospedeiro por um cimento constituído majoritariamente de uma proteína rica em glicina (MARUYAMA *et al.*, 2010).



Fig.4. Ciclo de vida do *R. microplus*. Fonte: Adaptado de GONZALES, 1995.

1.1.2. *R. sanguineus*

O carrapato marrom do cão *R. sanguineus* é um parasita, monotrópico (todos os estágios de desenvolvimento se alimentam de hospedeiros de uma mesma espécie) de três hospedeiros (cada fase de vida requer um novo hospedeiro para se alimentar). Cada estágio (Fig. 5) (larva, ninfa e adulto) alimenta-se em um hospedeiro diferente (DANTAS-TORRES, 2008). A fêmea adulta de *R. sanguineus* alimenta-se no hospedeiro por um período de 5 a 21 dias (NUTTALL, 1913; SRIVASTAVA, 1964; KOSHY *et al.*, 1983; PEGRAM *et al.*, 1987; IOFFE-USPENSKY *et al.*, 1997). Depois do ingurgitamento e desprendimento do hospedeiro a oviposição (16-18 dias) é precedida por uma fase de pré-oviposição (3-14 dias) (PETROVA-PIONTKOVSKAYA, 1947; KOCH, 1982). O período de incubação do ovo varia de 6 dias a algumas semanas (23 dias) (DANTAS-TORRES, 2008). Após a eclosão, as larvas alimentam-se de três a dez dias e mudam para o estágio de ninfa (NUTTALL, 1913; KOSHY *et al.*, 1983, PEGRAM *et al.*, 1987; IOFFE-USPENSKY *et al.*, 1997).

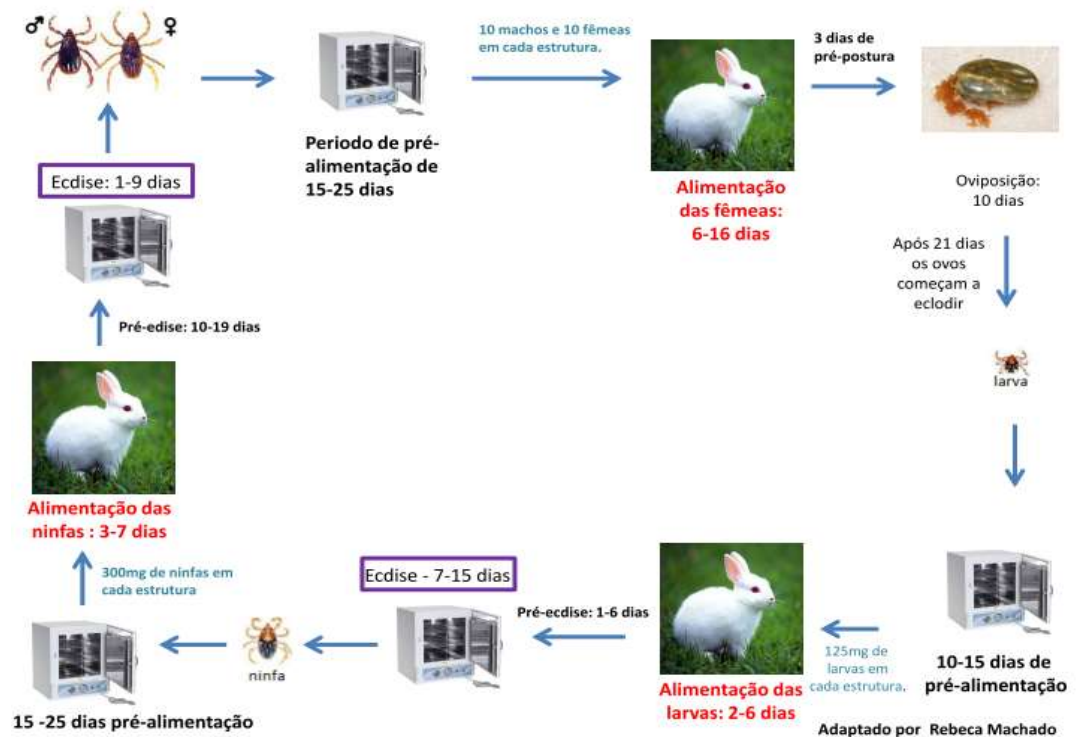


Fig.5. Ciclo de vida de *R. sanguineus*. Adaptado por Rebeca Machado (Não publicado).

O período de muda das larvas varia de 5 a 15 dias (PEGRAM *et al.*, 1987). Ninfas alimentam-se de 3 a 11 dias e mudam para adultos (IOFFE-USPENSKY *et al.*, 1997; SRIVASTAVA, 1964). O período de muda da ninfa varia de 9 a 47 dias (NUTTALL, 1913; KOSHY *et al.*, 1983; IOFFE-USPENSKY *et al.*, 1997). Larvas de *R. sanguineus* não alimentadas podem sobreviver por cerca de oito meses, enquanto ninfas e adultos não alimentados podem sobreviver por um período de 6 a 19 meses, respectivamente (GODDARD, 1997). Em condições favoráveis, o ciclo de vida pode ser completado em 63-91 dias (BECHARA *et al.*, 1995; GODDARD, 1997; LOULY *et al.*, 2007). Estas condições podem variar muito entre as populações devido a fatores como temperatura e disponibilidade de abrigo (DANTAS-TORRES, 2008).

1.1.3. *I. persulcatus*

O ciclo de vida do carrapato Taiga (*I. persulcatus*) foi estabelecido em laboratório (KONNAI *et al.*, 2008) e ainda não é bem conhecido em condições naturais. O ciclo de vida (Fig. 6) completo dura cerca de 250 dias, sendo que o período exato de pré-alimentação não é conhecido. Fêmeas adultas alimentam-se por 6 a 10 dias e têm um período de pré-oviposição com duração de 5-9 dias. O período de incubação dos ovos é de 30-40 dias. Após a eclosão as larvas têm um período de alimentação de 2 a 4 dias e mudam para ninfa, em 90 a 120 dias. As ninfas alimentam-se por 3 a 5 dias e mudam para adulto em 60 a 90 dias. Os períodos pré-muda de larva e ninfa de *I. persulcatus* são maiores do que outras espécies de carrapatos conhecidos (KONNAI *et al.*, 2008).

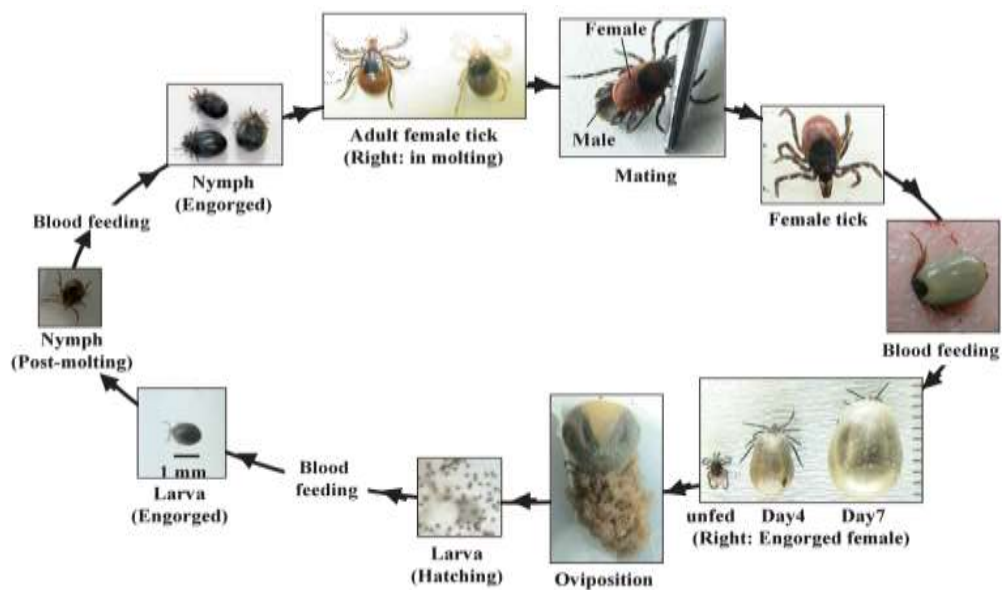


Fig.6. Ciclo de vida *I. persulcatus* em laboratório (KONNAI *et al.*, 2008).

1.2. Vacinas anti-carrapato

Devido ao impacto econômico e social das infestações por carrapatos e das doenças por ele transmitidas, tanto no homem como em animais, o controle do carrapato é uma prioridade global. Aplicação de acaricidas é ainda o principal componente das estratégias de controle do carrapato, que é feito exclusivamente com essas drogas ou integrados com outros métodos. O uso desses produtos químicos têm desvantagens como levar à seleção de populações de carrapatos resistentes aos acaricidas e também acarretar riscos de contaminação do ambiente e de alimentos pela permanência de resíduos das drogas ou seus metabólitos tanto no leite como na carne (GRAF *et al.*, 2004; HAJDUSEK *et al.*, 2013). Diante dessa situação, as vacinas anti-carrapato surgiram como uma forma alternativa para controlar a infestação por carrapato, evitando esses problemas (DE LA FUENTE *et al.*, 1999; REDONDO *et al.*, 1999; DE LA FUENTE *et al.*, 2007). As vantagens potenciais das vacinas incluem um custo-benefício vantajoso, evita a contaminação dos produtos de origem animal e do ambiente, evita o desenvolvimento de resistência à acaricidas, possibilita a prevenção da transmissão de agentes patogênicos e potencialmente pode ser aplicada a uma grande variedade de hospedeiros (DE LA FUENTE *et al.*, 1999; REDONDO *et al.*, 1999; DE LA FUENTE *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ-MALLON *et al.*, 2012). No entanto, o grande desafio no controle de carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos é identificar antígenos que confirmam um grau de proteção adequado.

Assim como os demais animais hematófagos, os carrapatos dependem de vários componentes da saliva tanto para manter o fluxo de sangue como também para evadirem-se das defesas imunológicas do hospedeiro. De fato, várias observações indicam que

proteínas da saliva de carrapato são cruciais para a alimentação sanguínea e transmissão eficiente de patógenos (GUERRERO *et al.*, 2012). Assim, os componentes da glândula salivar de carrapato têm atraído a atenção como possíveis candidatos a antígeno vacinal. Entre esses componentes incluem-se várias moléculas com atividade biológica na fixação do aparelho bucal, modulação do sistema imune inato e adquirido e manutenção do sangue na forma fluída (SAUER *et al.*, 1995; SIMO *et al.*, 2012). Os carrapatos possuem sistema de digestão intracelular no qual proteínas do sangue ingerido são digeridas no interior dos lisossomos por uma sucessão de proteases que operam em pH ácido (LARA *et al.*, 2005; SOJKA *et al.*, 2008; HORN *et al.*, 2009). Os anticorpos, do hospedeiro, presentes no sangue são capazes de não só atingir as células do sistema digestório como também de atingir a hemolinfa e ainda tecidos, onde ainda são funcionais e podem se ligar especificamente aos seus antígenos alvo (VAUGHAN *et al.*, 2002).

Como mencionado acima, as vantagens potenciais das vacinas incluem maior custo-benefício, evita a contaminação do ambiente, evita a resistência a drogas, permite prevenir a transmissão de agentes patogênicos e são potencialmente aplicáveis a uma grande variedade de hospedeiros (DE LA FUENTE *et al.*, 1999; REDONDO *et al.*, 1999; GRAF *et al.*, 2004; DE LA FUENTE *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 2009). Como outras vacinas anti-parasitárias, vacinas anti-carrapatos dependem da identificação de antígenos eficazes. Várias abordagens vêm sendo usadas para identificar antígenos e desenvolver uma vacina anti-carrapato eficaz e adequada para uso a campo, principalmente contra *R. microplus* (WILLADSEN, 2004 & 2006).

As primeiras tentativas de obter tal vacina foram feitas utilizando extratos brutos de carrapatos (WILLADSEN, 2004 & 2006; SONENSHINE *et al.*, 2006). A glicoproteína

Bm86, presente no tubo digestório de todas as fases da vida de *R. microplus* (MUHAMMAD *et al.*, 2008), se tornou o primeiro antígeno protetor contra carrapato, na realidade contra qualquer ectoparasita, usado em uma vacina comercial (WILLADSEN *et al.*, 1989; RODRIGUEZ *et al.*, 1995; WILLADSEN, 2004 & 2006; SONENSHINE *et al.*, 2006). A comercialização de vacinas baseadas na proteína Bm86 iniciou-se na década de 1990 e provou ser uma alternativa para o controle de infestações pelo carrapato *R. microplus* em algumas regiões (RODRIGUEZ *et al.*, 1995; DE LA FUENTE *et al.*, 1999). No entanto, a variação genética em sequências de aminoácidos da proteína Bm86 que foi verificada entre *R. microplus* de diferentes regiões geográficas afeta a eficácia das vacinas baseadas nessa proteína (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000). Com efeito, uma variação de 2,8 % na sequência de aminoácidos é suficiente para modificar a eficiência na imunoproteção (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 1999). Uma variação entre 3,4 a 6,1 % foi observada na sequência de aminoácidos de Bm86 de diferentes populações de *R. microplus*. A comparação entre os carrapatos de diversas regiões do Brasil, Argentina, Uruguai, Venezuela e Colômbia (SOSSAI *et al.*, 2005) revela grande variação na eficácia das vacinas baseadas na Bm86. Igualmente, uma variação entre 1,14 e 4,56 % foi verificada na sequência de aminoácidos da proteína Bm95, a variante da Bm86 presente em algumas populações de *R. microplus*. Embora várias proteínas, geralmente obtidas na forma recombinante foram testadas como antígeno, vacinas com Bm86 continuam a ser as únicas vacinas disponíveis comercialmente contra ectoparasitas. Isso ressalta a necessidade de desenvolver novas abordagens experimentais para encontrar antígenos mais adequados.

Como a vacina Bm86 não confere proteção suficiente e enfrenta limitações pela falta de especificidade em determinadas regiões geográficas e também os recentes relatos do aumento de populações de carrapato resistentes aos acaricidas químicos (GARCÍA-

GARCÍA *et al.*, 1999; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000), a busca de novas vacinas anti-carrapato permanece uma necessidade (WILLADSEN, 2004 & 2006). Entre os antígenos com potencial para entrar e na formulação de uma vacina contra *R. microplus* incluem-se proteínas envolvidas no armazenamento de ferro e na formação do cone de cemento que prende as peças bucais ao hospedeiro (PARIZI *et al.*, 2012). Nosso grupo de pesquisa investiga o potencial imunoprotetor de proteínas de carrapatos envolvidas em diferentes funções fisiológicas, como desintoxicação celular e desenvolvimento embrionário (LEAL *et al.*, 2006; SEIXAS *et al.*, 2008; PARIZI *et al.*, 2013). Notavelmente, outros grupos de pesquisa testaram diversos antígenos (GUERRERO *et al.*, 2012) quanto à sua eficácia anti-carrapato, sendo que apenas alguns deles levaram a resultados promissores (RODRIGUEZ *et al.*, 1995; SAUER *et al.*, 1995; WEISS *et al.*, 2004; PATARROYO *et al.*, 2002; HAJDUSEK *et al.*, 2010; ALMAZÁN *et al.*, 2010).

1.3. Significância do genes conservados

A identificação de antígenos protetores conservados entre várias espécies de parasitas ou vetores de espécies pode ajudar no desenvolvimento de uma vacina viável universal para o controle de várias infestações de artrópodes (PARIZI *et al.*, 2013). Pesquisas recentes forneceram evidências que suportam a ideia de desenvolver vacinas universais com o duplo objetivo de controlar as infestações de artrópodes e reduzir suas capacidades vetoriais para as transmissões de patógenos (PARIZI *et al.*, 2012). Foi mostrado que os mesmos epitopos conservados das proteínas subolesina e aquirina conferem proteção contra carrapato, mosquito e infestações por flebotomíneos (*sand fly*) (HAJDUSEK *et al.*, 2013; MERINO *et al.*, 2013). O gene *Ba86* de *B. annulatus*, ortólogo do gene *Bm86* de *R. microplus*, foi expresso na levedura *Pichia pastoris* e a proteína

recombinante purificada foi usada para imunizar bovinos e testar sua eficácia para o controle de infestações por *B. annulatus* e *R. microplus*. A vacinação com Ba86 reduziu o número de fêmeas que completaram o ciclo de vida parasitária, a oviposição e a fecundidade de ovos para ambas espécies, *B. annulatus* e *R. microplus* (CANALES *et al.*, 2009). De forma semelhante, nosso grupo de pesquisa mostrou que vacinação usando a proteína GST-HI de *H. longicornis* como antígeno protege contra infestações por *R. microplus*, mostrando outro exemplo de imunidade cruzada usando genes altamente conservados (PARIZI *et al.*, 2011).

1.4. Metaloproteases

Metalopeptidases ou metaloproteases (MPs, devido ao maior uso na literatura será usado o termo metaloprotease) (EC 3.4.24) são peptidases (hidrolisam ligação peptídica) que requer um cátion metálico (geralmente zinco) como cofator e estão distribuídas em todos os reinos da vida. Algumas delas têm como alvo ligações peptídicas internas de proteínas e oligopeptídeos e estão envolvidas em processos como a digestão e degradação de proteínas da ingesta, manutenção e remodelamento de tecidos. Também estão envolvidas no processamento proteolítico, clivagem altamente específica e limitada e uma ou de um número reduzido de ligações peptídicas que inativam ou ativam elas mesmas ou outras proenzimas, enzimas, peptídeos bioativos, inclusive repressores de DNA (GOMIS-RÜTH, 2003).

O grupo metzicina das MPs caracteriza-se por um motivo conservado de ligação a zinco conservado (H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H-X) no sítio ativo formado por uma α hélice central, uma Met-turn (triáde contendo metionina) e um motivo C-terminal rico em cisteína. Subdivide-se em famílias, sendo que as principais são as astacinas, serralisinas,

MPs de matriz e repolisinas (adamalinas/ADams) (GOMIS-RÜTH, 2009). A família repolisina caracteriza-se pela presença de um resíduo de ácido aspártico no C-terminal do motivo de ligação a zinco (H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H-D) (BOLDT *et al.*, 2001; JOH *et al.*, 2004).

O amplo espectro da atividade proteolítica das MPs incluem MPs fibrin(ogen)olíticas (FRANCISCHETTI *et al.*, 2003; DAGDA *et al.*, 2013) com atividade de desagregação de plaquetas, provavelmente pela hidrólise do fibrinogênio envolvido nas ligações cruzadas entre plaquetas (MAHLAKU, 2002). Isso sugere que MPs possuam um papel durante a alimentação dos carrapatos para manter o sangue facilmente acessível. Embora algumas MPs de carrapato foram já caracterizadas (FRANCISCHETTI *et al.*, 2003; HARNNOI *et al.*, 2007; DECREM *et al.*, 2008a,b; BARNARD *et al.*, 2012; ADAMSON *et al.*, 2013) a capacidade imunoprotetora dessas enzimas permanece a ser avaliada.

1.5. Mecanismo de ação das MPs

Com base na organização estrutural de diferentes combinações de domínios catalíticos as MPs de venenos de serpente foram classificadas em três classes de moléculas precursoras (P-I, P-II e P-III), divididas em 11 subclasses sendo que seis delas pertencem ao classe P-II. Formalmente chamada de P-IV, a classe heterotrimérica de MPs de venenos de serpente é agora incluída na classe P-III como uma subclasse (P-IIIId) (MOURA-DASILVA *et al.*, 2011). MPs da classe P-I têm massa molecular entre 20-30 kDa e da classe P-II têm a massa molecular de 30-60 kDa. A classe P-III tem um domínio rico em cisteína com um padrão característico de uma sequência de 11 resíduos de cisteína na região C-terminal, variando entre 60-90 kDa (JIA *et al.*, 1996; HATI *et al.*, 1999).

A atividade catalítica das MPs depende da utilização da coordenação com o íon metálico. O íon metálico propicia forte atração nucleofílica para ajudar o ataque por uma molécula de água à ligação peptídica alvo. As enzimas nativas tem uma molécula de água coordenada no quarto sítio tetraédrico (os grupos ligantes para metais são as cadeias laterais de dois resíduos de histidina e de um de ácido glutâmico). Esta água pode se deslocar através da coordenação da carbonila do substrato para o átomo de metal, mas pensa-se que permaneça no sítio ativo. Supõe-se que esta molécula de água permanece coordenada ao átomo de metal pelo menos no estado de transição. A molécula de água também liga-se por uma ligação de hidrogênio ao grupo carbonila do resíduo de ácido glutâmico, o qual serve como uma base geral para remover um próton e auxiliar o ataque da carbonila do substrato peptídico. Um próton deve ser transferido para um átomo de saída (nitrogênio) e este pode ser proveniente do ácido glutâmico. Esse ácido glutâmico serviria como um sistema de transferência, em analogia com um dos grupos catalíticos das proteases aspárticas e a His nas cisteína-proteases e serina nas serina-proteases (BEYNON, & BOND, 1990).

Como mencionado anteriormente, o grupo metzincina das MPs participa no desenvolvimento de tecidos, manutenção, remodelação e degradação de proteínas inespecífica. Uma melhor compreensão do mecanismo de reação das MPs do grupo metzincina é importante para encontrar inibidores específicos destas enzimas. O mecanismo catalítico das metzincinas não é tão bem conhecido como o mecanismo das gluzincinas e outras enzimas (MANSFELD, 2007). Esta complexidade deve-se principalmente à diversidade de subfamílias pertencentes ao grupo metzincina, sendo que cada MP apresenta vários modos de ativação proteolítica. As metzincinas possuem um resíduo de glicina, ácido glutâmico e três resíduos de histidina no motivo do sítio ativo (H-

E-X-X-H-X-X-G-X-X-H-X), formando a ligação com zinco, além de ser caracterizada por uma “*Met-turn*” nas vizinhanças do sítio ativo (STÖCKER *et al.*, 1995). A glicina conservada neste motivo é importante para a formação da “*Met-turn*”, que traz os três ligante de zinco para a posição desejada (BODE *et al.*, 1992). A coordenação do íon zinco com aminoácidos conservados do sitio ativo e com moléculas de água são essenciais para as propriedades catalíticas das MPs do grupo da metzincina. As reprotolisinas/ADAMs (subgrupo da metzincina) são enzimas multidomínios sintetizadas como zimogênios cujos pró-domínios são removidos ainda na via secretória pela ação de convertases. No entanto estudos recente mostram que a ADAMs-13 é ativa mesmo sem a remoção do pró-peptídeo (HITE *et al.*, 1992; SOMERVILLE *et al.*, 2003; APTE, 2004). A ativação de MPs da família reprotolisina ter sido proposta ocorre por cisão proteolítica do pródomínio seguido de um mecanismo tipo “interruptor de cisteína” que envolve um resíduo de cisteína localizado dentro de um motivo altamente conservada no pródomínio.

4-aminofenilmercuriacetato (APMA) é um conhecido de ativador MPs e seu mecanismo de ativação foi originalmente sugerido ocorrer por remoção do prodomínio da MP através da associação preferencial com o resíduo de cisteína do “interruptor de cisteína”. Mutações na região do prodomínio sugerem que o mecanismo de ativação pode ser mais complicado e relacionado com alterações conformacionais no prodomínio (GALAZKA *et al.*, 1999). APMA também ativa o fator de crescimento dependente de ADAMs, presumivelmente através de um mecanismo semelhante da ativação de MP (MILLA *et al.*, 1999; MERLOS-SUAREZ *et al.*, 2001). A ativação através da remoção do domínio zimogênico permite a passagem de um estado, inativo, no qual o resíduo de cisteína dentro do motivo conservado PRCGVDP substitui a molécula de solvente catalítica na coordenação com zinco, para o estado de enzima ativa com a cisteína

acessível ("interruptor de cisteína" ou mecanismo tipo velcro). Interruptores de cisteína semelhantes são também propostos em outros tipos zimogênicos de MPs (MILLA *et al.*, 1999; MERLOS-SUÁREZ *et al.*, 2001).

1.6. Papel de MPs na hematofagia e patologia

MPs regulam um grande número de funções celulares, incluindo processos complexos, alguns típicos de células tumorais. O envolvimento de MPs em metástase tumoral tem recebido grande atenção nos últimos anos, resultando em grande quantidade de estudos sobre o papel desta família fascinante de proteínas (LOECHEL *et al.*, 2000). A atividade de MPs é essencial para o crescimento de tumores, metástases e degradação proteolítica de vários componentes da matriz extracelular (ECM), alterações das interações célula-célula e célula-ECM, migração de células e angiogênese (GIALELI *et al.*, 2011). Mecanismos que particularmente favorecem a atividade das MPs em contribuir para a proliferação de células tumorais, para a modulação da disponibilidade de fatores de crescimento e alterações em receptores da superfície celular. Metaloproteases da matriz (MMP) e reprotisina (também chamada de ADAMs, metaloprotease edesintegrina) liberam precursores de fatores de crescimento da membrana celular, como os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), moléculas que promovem proliferação celular (LOECHEL *et al.*, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2005). MPs, especialmente MMPs, também contribuem para a angiogênese, através da degradação da membrana basal permitindo assim que células endoteliais migrem para novos tecidos e através da libertação de diversos fatores, como o bFGF (*basic fibroblast growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e TGF- β (*transforming growth factor beta*) (RUNDHAUG, 2003). Estas ideias são apoiadas pelo

fato de que inibidores de MMPs inibem a angiogênese em modelos animais (NAGLICH *et al.*, 2001).

Existe uma associação óbvia entre inflamação e câncer com MPs, especialmente inflamação persistente (DERYUGINA & QUIGLEY, 2006). O papel elegante de células inflamatórias, especialmente neutrófilos, macrófagos e células T na progressão do câncer é analisado em diversos estudos (BALKWILL & MANTOVANI, 2001; NALDINI & CARRARO, 2005; BJÖRKLUND & KOIVUNEN, 2005). Células tumorais, juntamente com outros fatores pró-inflamatórias, também produzem MPs, induzindo influxo inflamatório para o local de desenvolvimento do tumor primário e angiogênese (LITTLEPAGE *et al.*, 2005).

MPs são componentes importantes de venenos hemorrágicos devido ação hemorrágica decorrente da degradação da matriz extracelular e degradação de fibrinogênio e fibrina (FRANCISCHETTI *et al.*, 2003). MP de aranha tem sido responsabilizada pela hemorragia e necrose do tecido na região da picada (NAGARAJU *et al.*, 2007). Esta hemorragia é causada principalmente pela destruição de componentes estruturais da membrana basal em torno dos vasos sanguíneos e dos capilares. Toxinas hemorrágicas comumente encontradas em venenos de serpentes são principalmente MPs (BJARNASON & FOX, 1994). A maioria dessas MPs de venenos são sintetizadas como zimogênios e após processamento proteolítico, produzem uma grande variedade de proteínas multifuncionais (TANJONI *et al.*, 2003). MPs de venenos de serpentes são agentes capazes de hidrolisar proteínas importantes dos tecido, incluindo fibrinogênio, fibronectina, laminina, colágeno e proteoglicanos da membrana basal endotelial (FOX & SERRANO, 2008). MP hemorrágica isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* possui

também atividade bactericida contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (MAZZI *et al.*, 2004). Além disso, estudo mais recente mostram um nível da MMP-9 e proporção da MMP-9/TIMP-1 no soro de pacientes de encefalite causada por carrapatos (TBE) significativamente alta, sugerindo que esta MP pode servir como um indicador de dano inflamatório cerebral na encefalite causada por carrapato (PALUS *et al.*, 2013).

1.7. MPs de artrópodes

Ortólogos de MPs estão presentes ao longo de quase toda a escala evolutiva, desde bactérias até mamíferos (HUOVILA *et al.*, 2005). As MPs de vertebrados e invertebrados são altamente conservadas (MACOURS & HENS, 2004), e tem sido sugerido que nos insetos MPs são componentes importantes em sistemas de sinalização, sendo responsáveis pelo ajuste fino da fisiologia através do processamento ou inativação de peptídeos reguladores. No genoma de *Drosophila melanogaster* foram encontrados cinco genes codificando para ADAMs e dois genes codificando para MMPs. ADAMs controlam processos biológicos, durante o desenvolvimento e diferenciação, principalmente atuando na remoção de regiões extracelulares de proteínas de membrana (BLOBEL, 2005; MEYER *et al.*, 2011), em relação às funções fisiológicas dos domínios individuais de proteínas desta família, o processo conhecido como derramamento ectodomínio caracteristicamente depende de domínios de MPs (BLOBEL, 2005). Mutações no gene que codifica *cuzbaniana*, um membro do grupo ADAMs, em *D. melanogaster* fazem com que a asa apresente uma série de defeitos devido ao retardamento na orientação de axônios (FAMBROUGH *et al.*, 1996). Ao contrário, MPs não são imprescindíveis para o desenvolvimento embrionário de *D. melanogaster*, mas sim para a remodelação dos tecidos (PAGE-McCAW *et al.*, 2003). Algumas MPs participam contribuindo na

regulação do arresto de processos-chave de desenvolvimento de *D. melanogaster* como a estimulação de vias de transdução de sinal Notch durante a formação do padrão do disco embrionário (SOTILLOS *et al.*, 1997).

Para testar se a atividade de MPs é importante para o direcionamento do neurônio da pata, embriões de gafanhoto foram cultivados em meio com um inibidor de MPs. A inibição levou a uma série de erros de orientação do neurônio. A maioria dos defeitos foi caracterizada por defasciculação dos axônios Ti1, com um axônio estendendo-se dorsalmente e o outro ventralmente (LEGG & OCONNOR, 2003). No escorpião *T. serrulatus*, MPs clivam v-SNAREs (*vesicle N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) e também clivam VAMP (*vesicle-associated membrane protein*). Estas propriedades tornam esta proteína uma ferramenta complementar valiosa entre as poucas disponíveis para estudar a estrutura e função de SNAREs (FLETCHER *et al.*, 2010). Além disso, foi mostrado que MPs do veneno de lagartas possuem atividade fibrinogenolítica, gelatinolítica e caseinolítica (MALTA *et al.*, 2008).

1.8. MPs de carrapatos

Glândulas salivares de carrapatos são estudadas em todo o mundo já por várias décadas, refletindo a sua enorme importância na alimentação sanguínea e transmissão de vários patógenos. As glândulas salivares das fêmeas dos carrapatos ixodídeos aumentam seu teor de proteínas e de massa em mais de 25 vezes durante a alimentação, ao mesmo tempo que os acini tipos II e III apresentam grandes alterações morfológicas (BOWMAN & SAUER, 2004). Simultaneamente há aumento na atividade de várias proteases salivares. Os estudos sobre MPs de carrapatos são escassos e o papel dessas enzimas na fisiologia do carrapato ainda não está bem elucidado. Sabe-se, porém que a regulação dessas proteínas

e outros componentes da glândula salivar do carrapato está relacionada com o processo de alimentação sanguínea. Além disso, essas proteínas da glândula salivar também interferem na capacidade de transmitir patógenos (FRANCISCHETTI *et al.*, 2003).

Desintegrinas constituem uma família de proteínas ricas em cisteína envolvidas em várias funções fisiológicas, incluindo inibição da adesão celular, migração e angiogênese. Geralmente, desintegrinas são processadas a partir dos precursores de MPs da classe PII. Anteriormente, desintegrinas e Sampas foram consideradas como provenientes de proteínas precursoras comuns (KINI & EVANS, 1992; ASSUMPCAO *et al.*, 2012). Uma vez que desintegrinas agem como inibidores de agregação plaquetária foi proposto que as desintegrinas presentes na saliva de carrapatos e outros hematófagos participam na facilitação da alimentação sanguínea (ASSUMPCAO *et al.*, 2012). Os dados da literatura reforçam a hipótese de que membros desta família de proteína participam na manutenção da ingesta sanguínea no estado líquido e na digestão de proteínas do sangue.

1.9. MPs de *I. scapularis*

Foi sugerido que nas várias espécies de carrapato as MPs são importantes para inibir a agregação de plaquetas e inibir a coagulação do sangue por degradar fibrinogênio e fibrina, facilitando assim o repasto sanguíneo (CHMELAR *et al.*, 2012). Dipeptidil-carboxipeptidases com atividade cininásica (inativação de bradicinina) foram encontradas na glândula salivar e na saliva de *I. scapularis* (RIBEIRO & MATHER, 1998) e de *R. microplus* (BASTIANI *et al.*, 2002; discutido abaixo). Mais tarde, foi mostrado que as MPs de *I. scapularis* classificam-se como reprotinas, do grupo metzincina (FRANCISCHETTI *et al.*, 2003). A sequência de aminoácidos deduzida do gene desta proteína (488 aminoácidos) contém também regiões pré- e pró-enzimas, sendo que o

motivo de ligação a zinco e a região rica em cisteína têm similaridade com SVMs. Uma desta MP de glandula salivar possui atividade sobre a cadeia A α , tanto do fibrinogênio como da fibrina. Duas outras MPs foram identificadas na saliva de *I. scapularis* (VALENZUELA *et al.*, 2002). Elas possuem o domínio rico em cisteína, mas no entanto possuem poucas semelhanças com MPs da família das desintegrinas. PACKILA & GUILFOILE, (2002) identificaram e clonaram um outro gene de *I. scapularis* que tem estreita semelhança com sequências de MPs, particularmente com o domínio do sítio ativo, onde o Zn⁺² se liga. Análise da transcrição mostra que esse gene é transcrito especificamente no sexo masculino e não é transcrito na fêmea. Os autores sugerem que esta proteína é importante para a espermiogênese e/ou para a fertilização. A saliva de *I. scapularis* possui MPs com atividade fibrinolítica e fibrinogenolítica (FRANCISCHETTI *et al.*, 2003), reforçando a hipótese de que MPs participam dos mecanismos de defesas hemostáticas dos hospedeiros, permitindo ou ao menos facilitando a alimentação de sangue pelo carrapato. A inibição da proliferação celular endotelial microvascular e a degradação de ambas subunidades (α e β) das integrinas $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 1\beta 1$ pela saliva de *I. scapularis* sugere que MPs sejam as responsáveis por essas atividades (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010; KAZIMIROVA & STIBRANIOVA, 2013). Esta hipótese foi ainda confirmada pelo fato de que a presença de EDTA e 1,10-fenantrolina, mas na ausência de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) inibe a degradação da integrina $\alpha 5\beta 1$ pela saliva e *I. scapularis* (FRANCISCHETTI *et al.*, 2005a). As atividades α -fibrinogenase e fibrinolítica de MPs salivares de *I. scapularis* e *Ornithodoros savignyi* podem também ter papel importante na desagregação de plaquetas, provavelmente pela hidrólise de moléculas de fibrinogênio responsáveis pelas ligações cruzadas entre plaquetas já agregadas. (MAHLAKU, 2002). Utilizando diversos bancos com dados de genoma e transcriptomas

de *I. scapularis*, foram encontradas 233 proteases putativamente ativas e 150 proteases putativamente inativas. As proteases supostamente ativas foram incluídas no degradoma (o repertório completo de proteases codificadas pelo genoma) dessa espécie. Cerca de 28,3% (66/233) das MPs de *I. scapularis* são putativamente ativas (MULENGA & ERIKSON, 2011).

1.10. MPs de *I. ricinus*

Uma família de MPs putativas denominados de "Metis MPs", foi identificada e caracterizada na glândula salivar de *I. ricinus*. As seqüências de aminoácidos mostram que todas elas pertencem a MPs da família reprotolisina. A inibição da expressão de dessas MPs por iRNA prejudica a alimentação sanguínea e aumenta a taxa de mortalidade dos carrapatos. Glândula salivar tratada com siRNA (*short interfering RNA*) tendo como alvo mRNA de determinadas MPs levam à diminuição da atividade fibrinolítica da glândula salivar (DECREM *et al.*, 2008a). Transcritos de todas essas MPs foram encontrados na glândula salivar. Isso fortalece os argumentos dos autores sobre participação desta família de proteases na inibição da cicatrização de feridas após a picada por carrapato, facilitando assim a alimentação de sangue. A vacinação de hospedeiros com uma dessas MPs recombinante impede que carrapatos concluam o repasto de sanguíneo. Carrapatos alimentados em hospedeiros vacinados com essa MP não tem a taxa de sobrevivência e nem o tempo de alimentação alterados, mas tanto a taxa de ganho de peso como a postura são reduzidas (DECREM *et al.*, 2008b). Uma análise mais aprofundada foi realizada para determinar as propriedades antigênicas dessas MPs. Todas as cinco ORFs de Metis foram clonadas em vetor de expressão de mamífero e estas construções foram usadas para a imunização de camundongos. Os resultados mostraram que Metis1, Metis3 e Metis4

induziram a geração de anticorpos e Metis2 e Metis5 não. O soro anti-Metis3 reconheceu Metis3 e Metis4, enquanto que o soro anti-Metis1 reagiu com Metis1 e Metis2. Nenhum dos antissoros reconheceu Metis5. Estes resultados são explicados com base na hipótese de que três epitopos de Metis são compartilhados, mas não exatamente iguais conforme a Metis (DECREM *et al.*, 2008a,b).

1.11. MPs de *H. longicornis*

Seis genes que codificam MPs foram identificados da glândula salivar do *H. longicornis*. Essas MPs possuem um pró-domínio e um domínio MPs rico em cisteína, característico da família reprotisina. As diferenças encontradas nas sequências de aminoácidos no interior do sítio ativo dessas MPs sugerem que possivelmente essas MPs possuam elevado grau de preferência pelo substrato proteico. A transcrição de todas as MPs de glândulas salivares é fortemente regulada pelo repasto sanguíneo. Tentativas de expressar a proteína completa foram infrutíferas devido à baixa solubilidade da uma MP (hESTMP1). Apenas proteínas truncadas sem atividade enzimática foram obtidas por expressão heteróloga, o que impede a caracterização das propriedades cinética da enzima. A localização da proteína nativa em tecidos de carrapato utilizando metodologia de imunofluorescência indireta mostra que uma MP (hESTMP1) está enriquecida no citoplasma das células dos ácinos das glândulas salivares, principalmente ácinos III, de carrapatos parcialmente alimentados, mas não nos grânulos (HARNNOI *et al.*, 2007). Outro grupo expresso uma dessas MP e mostrou ter potencial como antígeno imunoprotetor resultando em mortalidade em ninfa e carrapatos adultos (IMAMURA *et al.*, 2009).

1.12. MPs de *R. microplus*

Uma MP de *R. microplus*, denominada de BooKase (Boophilus Kininase), foi identificada e parcialmente caracterizada quanto às suas propriedades catalíticas. Essa MP, que é ativada por tióis e também por íons metálicos, parece ter um papel importante uma vez que inativa bradicinina, sendo que a BooKase é específica para a hidrólise da ligação peptídica Phe⁵-Ser⁶ da bradicinina (BASTIANI *et al.*, 2002). Em *R. microplus*, a inativação específica da expressão de MPs por iRNA afeta significativamente o peso médio do ovo e a taxa de oviposição (BARNARD *et al.*, 2012).

Em mamíferos a transcrição de MPs é induzida por vários sinais tais como citocinas, fatores de crescimento e stress mecânico (OVERALL & LÓPEZ-OTÍN, 2002). A sinalização para a transcrição de MPs em carrapatos ainda é totalmente desconhecida, mas devido ao grande volume de sangue que é ingerido supõem-se que tenha um papel relevante. A transcrição de várias MPs na glândula salivar de carrapato sugere preliminarmente que essas enzimas participem nos mecanismos envolvidos na alimentação. Essa hipótese tem sido reforçada pela demonstração de que MPs salivares de carrapatos possuem atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica.

1.13. Inibidores de MPs de carrapato

Entre os inibidores conhecidos de MPs destacam-se proteínas contendo seqüências similares à região C-terminal de MPs inibidoras de tecidos como a proteína PCPE (*procollagen C-terminal proteinase enhancer*), a proteína RECK (*reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*), netrinas, TIMPs (tissue inhibitors of MPs), TFPI-2 (tissue factor pathway inhibitor) e α -macroglobulina. Embora o grande número de

estudos sobre inibidores de MPs em várias espécies, em carrapatos não foi confirmada a presença de nenhum desses inibidores (BAKER *et al.*, 2002).

Em *Rhipicephalus bursa* foi identificado e caracterizado o gene codificante que pode ser o primeiro inibidor de MPs encontrado em carrapatos, especificamente um inibidor de carboxipeptidase (AROLAS *et al.*, 2005). Esta proteína tem baixa similaridade de sequência com outras proteínas conhecidas mas a sua extremidade C-terminal assemelha-se com inibidores carboxi-MPs das famílias Solanaceae, Ascari, e Hirudo. A determinação da estrutura tridimensional do inibidor de *R. bursa* ligado a carboxipeptidases A (CPA) bovina e carboxipeptidase B (CPB) humana mostra um modo único de ligação das carboxipeptidases (AROLAS *et al.*, 2006). Posteriormente foi demonstrado outro inibidor de MPs de *H. longicornis* em ovário e em nenhum outro tecido (GONG *et al.*, 2007). Devido a localização restrita no ovário parece que este inibidor tem uma função específica na reprodução. Embora esse inibidor apresente semelhança com defensinas (peptídeo antimicrobiano), testes com modelos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas descartaram a hipótese de que essa molécula participaria das defesas antimicrobiana de carrapatos (GONG *et al.*, 2007).

1.13. MPs em estudos de “sialotranscriptômica e mialômica” de carrapato

Recentemente, quatro MPs putativas foram encontradas em bibliotecas de cDNA do intestino do carrapato *Dermacentor variabilis*, geradas a partir de carrapatos fêmeas em diferentes estágios de alimentação. Como transcritos de MPs foram encontrados somente no intestino de carrapatos não alimentados ou que se alimentaram por apenas 2 dias, os autores sugerem que essas MPs podem ter um papel antimicrobiano, controlando a flora intestinal (ANDERSON *et al.*, 2008). Da mesma forma, o sialotranscriptoma

(transcriptoma do glandula salivar) do carrapato *Amblyomma maculatum* sugere a presença de várias proteases na glândula salivar desse carrapato. Entre estas proteases, as MPs foram predominantes, correspondendo a 2,6% com 268 seqüências codificadoras (KARIM *et al.*, 2011). Vários outros estudos identificaram MPs em várias espécies de carrapatos, incluindo *I. ricinus* (CHMELAR *et al.*, 2008), *I. scapularis* (MANS *et al.*, 2008), *Argas monolakensis* (MANS *et al.*, 2008), *R. sanguineus* (ANATRIELLO *et al.*, 2010), *Ornithodoros parkeri* (FRANCISCHETTI *et al.*, 2008a), *Ornithodoros coriaceus* (FRANCISCHETTI *et al.*, 2008b), *Amblyomma variegatum* (RIBEIRO *et al.*, 2011), *Hyalomma marginado rufipes* (FRANCISCHETTI *et al.*, 2011), *Antricola delacruzii* (RIBEIRO *et al.*, 2012), *Ixodes pacificus* (FRANCISCHETTI *et al.*, 2005b) e o carrapato *Rhipicephalus pulchellu*, da zebra (apenas sequencias depositadas no Genebank).

O conhecimento sobre o papel destas proteínas é importante para o melhor entendimento da fisiologia das várias espécies de carrapato e das relações dos parasitos com seus hospedeiros. Esse conhecimento é importante também para testes de vacinação seguidos de desafios com carrapato para verificar a validade da hipótese que propõe que o bloqueio de MPs prejudica o carrapato de forma que MPs podem servir como antígeno vacinante para uma ou mais espécies de carrapato.

2. Objetivo geral

Este trabalho tem como foco a identificação de MPs em três espécies de carrapatos, *R. sanguineus* (Rs-MPs), *I. persulcatus* (Ip-MPs) e *R. microplus* (BrRm-MPs) e testar a hipótese que propõe MP como antígeno para vacinas imunoprotetoras contra carrapato.

2.1. Objetivos específicos

- ❖ Identificar MPs em três espécies de carrapato (*R. microplus*, *R. sanguineus* e *I. persulcatus*).
- ❖ Determinar em que tecido ou fase de vida cada uma das sequencias codificando para potenciais MPs são transcritas.
- ❖ Seleção da MP com potencial para uso em uma possível vacina.
- ❖ Obter a expressão heteróloga da MP selecionada.
- ❖ Testar a hipótese de que MP selecionada é um antígeno imunoprotetor.

3. Capítulo 1

Artigo 1. Aceito no periódico “*Experimental and Applied Acarology*”.

Reprolysin metalloproteases from *Ixodes persulcatus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus* *microplus* ticks

Abid Ali · Lucas Tirloni · Masayoshi Isezaki · Adriana Seixas ·
Satoru Konnai · Kazuhiko Ohashi · Itabajara da Silva Vaz Junior ·
Carlos Termignoni

Received: 5 December 2013 / Accepted: 5 March 2014
© Springer International Publishing Switzerland 2014

Abstract Metalloproteases (MPs) have been considered essential for blood feeding and other physiological functions in several hematophagous animals, including ticks. We report the characterization of MP sequences of three important ticks from Asia, Africa and America: *Ixodes persulcatus* (Ip-MPs), *Rhipicephalus sanguineus* (Rs-MPs) and *R. microplus* (BrRm-MPs). Amino acid sequence identity between *R. microplus* and *R. sanguineus* MPs ranged from 76 to 100 %, and identities among *I. persulcatus*, *I. ricinus* and *I. scapularis* MP sequences ranged from 88 to 97 %. This high sequence identity and typical functional motifs show that all sequences are MPs. The presence of a zinc binding site, a Met-turn and cysteine rich domain at the C-terminal region indicates that these proteins belong to the reprolysin family of MPs. Differences in amino acid sequences of BrRm-

A. Ali · L. Tirloni · A. Seixas · I. da Silva Vaz Junior · C. Termignoni (✉)
Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, C.P. 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil
e-mail: ctermignoni@cbiot.ufrgs.br

A. Ali · C. Termignoni
Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Rua Ramiro Barcelos, 2600, Porto Alegre, RS 90035-000, Brazil

A. Ali
Institute of Biotechnology Genetic Engineering, The University of Agriculture, Peshawar 25130,
Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan

M. Isezaki · S. Konnai · K. Ohashi
Laboratory of Infectious Diseases, Department of Disease Control, Graduate School of Veterinary
Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0818, Japan

A. Seixas
Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto
Alegre, Rua Sarmento Leite 245, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

I. da Silva Vaz Junior
Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Avenida Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil

MP1, BrRm-MP2, BrRm-MP4 and BrRm-MP5 (from Porto Alegre strain ticks) were 6, 2, 7 and 5 %, respectively, when compared with sequences deposited in GenBank for the same genes from other *R. microplus* isolates. Analyses of MPs predicted that they have various highly antigenic regions. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed the presence of transcripts in salivary glands of partially and fully fed female ticks. None of these transcripts were observed in males (except BrRm-MP4) and eggs. These enzymes may be functional components required during tick feeding to manipulate host defenses and support tick hematophagy.

Keywords Metalloproteases · Reprolysin · Polymorphism · *Ixodes* · *Rhipicephalus* · Hematophagy

Introduction

Ticks are blood-sucking ectoparasites totally dependent on blood-meal from hosts for survival (Anisuzzaman Islam et al. 2011; Chmelar et al. 2012). Tick infestations cause economic losses in livestock industry by decreasing milk production, body weight impairment and leather damage, apart from vectoring several pathogens of bacterial, viral, and fungal infections (Parizi et al. 2012). The tick *Rhipicephalus microplus* is a one-host tick, endemic between parallels 32°N and 32°S, a region which covers the main cattle breeding countries. *Ixodes persulcatus*, also known as the taiga tick, is a three-host tick, prominently distributed in the Taiga zone (Far East Asia, Japan, Russia, northern China, Mongolia, and Kazakhstan) (Kovalev and Mukhacheva 2012). It has been associated with the transmission of various etiologic pathogens such as the tick-borne encephalitis virus, *Borrelia burgdorferis* and *Anaplasma phagocytophilum* (Kang and Jang 1985; Hayasaka et al. 2001; Shpynov et al. 2004; Wuritu et al. 2009; Konnai et al. 2011). *Rhipicephalus sanguineus* also is a three-host tick which feeds primarily on dogs and occasionally on other hosts (Ghosh et al. 2007; Dantas-Torres 2009; Gray et al. 2013). It is a vector of several pathogens for dogs, such as *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, and *Rickettsia conorii* (Brumpt 1932; Dantas-Torres 2008), apart from *R. conorii* and *Rickettsia rickettsii*, which cause human Mediterranean spotted fever, Brazilian spotted fever and Rocky Mountain spotted fever (Moraes-Filho et al. 2009; Dantas-Torres et al. 2012).

Like other blood feeders, ticks produce various molecules to modulate host defenses in order to maintain their blood feeding capacity. Among these modulatory molecules, bradykinin degrading enzymes (Ribeiro and Mather 1998; Bastiani et al. 2002), platelet inhibitory prostaglandins (Bowman et al. 1996; Aljamali et al. 2002; Francischetti 2010), chymotrypsin inhibitors (Lima et al. 2010), thrombin inhibitors (van de Locht et al. 1996; Zhu et al. 1997; Nienaber et al. 1999; Horn et al. 2000), factor Xa inhibitors (Antuch et al. 1994; Joubert et al. 1995; Maritz-Olivier et al. 2007), immunomodulators (Kotsyfakis et al. 2006; Preston et al. 2013), apyrases (Mans et al. 1998) and adenosine deaminases (Mohamed 2006) are examples of tick salivary molecules that interfere with host homeostasis effecting blood coagulation, innate and adaptive immune response (Francischetti et al. 2003; Imamura et al. 2009). Among these modulatory molecules, tick salivary gland metalloproteases (MPs) have also been considered essential for tick blood feeding (Francischetti et al. 2003; Decrem et al. 2008a). The existence of MPs in prokaryotes as well as eukaryotes (Kearns et al. 2002) suggests that these molecules are fundamental to life. In mammals, MPs are important in many aspects of biology, ranging from cell

proliferation, differentiation and remodeling extracellular matrix to vascularization and cell migration (Chang and Werb 2001). Studies focusing on tick MPs are scarce, and the role these molecules play in parasitism remains unclear. Nevertheless, some studies show that many tick MPs belong to the metzincin clan of MPs (Harnnoi et al. 2007; Decrem et al. 2008a, b; Barnard et al. 2012).

Metzincins have been found to participate in tissue development and remodeling, maintenance, unspecific protein degradation of intake proteins as well as in the highly specific cleavage events to activate or inactivate themselves or other proenzymes and bioactive peptides (Chang and Werb 2001; Gomis-Rüth 2009). Metzincin has a characteristically conserved zinc binding consensus motif (H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H-X) at the active site integrated into the central α helix, a Met-turn (a methionine containing triad) and a cysteine-rich C-terminal motif. It is subdivided into major families, including as-tacins, serralyisins, matrix MPs, snapalysins, leishmanolysins, eucolycins, pappalysins and reprolysins (adamalysins/ADams) (Gomis-Rüth 2009). The reprolysin family is characterized by the presence of an aspartic amino acid residue at the C-terminus of its zinc binding motif (H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H-D) (Boldt et al. 2001; Joh et al. 2004).

The broad spectrum of proteolytic activities of ticks MPs including fibrin(ogen)olytic MPs (Francischetti et al. 2003; Dagda et al. 2013) and disaggregation of platelets, probably by hydrolyzing the fibrinogen cross-linked platelets (Mahlaku 2002; Maritz-Olivier et al. 2007), suggests that MPs play a role during tick feeding in order to maintain blood easily accessible. Thus, knowledge about the role of these proteins is important for a better understanding of tick physiology. In this sense, the objective of the present study was to identify the MPs from three tick species, *R. sanguineus* (Rs-MPs) *I. persulcatus* (Ip-MPs) and *R. microplus* MPs (BrRm-MPs).

Materials and methods

Tick rearing

Rhipicephalus microplus

Partially and fully engorged adult *R. microplus* female ticks (Porto Alegre strain) were maintained by experimental infestation on cattle (*Bos taurus taurus*). Tick-infested animals were maintained isolated in an experimental animal facility at the Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Partially engorged *R. microplus* females (21–23 days old) and males were hand-picked directly from the host, while fully engorged females were collected after spontaneous detachment. Fully engorged *R. microplus* ticks were maintained in an incubator, at 27 °C and 85 % relative humidity for laying eggs. Larvae were collected 5 days after hatching.

Rhipicephalus sanguineus

Adult ticks were collected in Rio de Janeiro (Brazil), and maintained by experimental infestation on rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) which were kept in isolated hutches at the Faculdade de Veterinária, UFRGS. Partially fed female (5 days post-infestation) and males were collected directly from rabbits, while fully engorged females were collected after spontaneous detachment. After collection, males and females were separated and kept at

27 °C and 85 % relative humidity for laying eggs. Like *R. microplus*, larvae were collected 5 days after hatching.

Ixodes persulcatus

Ticks were obtained from a colony kept at the Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University (Konnai et al. 2008). Host-seeking *I. persulcatus* adult ticks were collected from the lower vegetation in forests in the Nissho area, Hidaka district, Hokkaido, Japan. After collection, ticks were maintained by experimental infestation on Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), and adult engorged female ticks that had detached of the animals were collected.

All experiments were carried out in accordance with ethical guidelines on animal experimentation and were approved by local ethical committees.

RNA extraction and cDNA synthesis

For RNA extraction, ten *R. microplus* and ten *R. sanguineus* ticks were washed with 70 % ethanol before dissection using a scalpel blade, and any host contaminating tissue was removed using surgical forceps. Ticks were put in a Petri dish containing cold phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.2), under a stereomicroscope. After removal of the dorsal surface, ovaries (OV), midguts (MG), salivary glands (SG) and fat bodies (FB) were separated carefully and added to TRIzol reagent (Invitrogen). Total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. Whole male (M), eggs (E) and larvae (L) were macerated in TRIzol for RNA isolation, as mentioned above. For cDNA synthesis, 5 µg of total RNA was reverse transcribed using oligo-dT priming (Invitrogen) and SuperScript II (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

After isolation of RNA from whole *I. persulcatus* adult females, a cDNA library was developed using the In-Fusion SMARTer cDNA library kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions. To determine the expression profile of Ip-MPs during various life stages, RNA was extracted from salivary glands (SG), midguts (MG) and cytoskeletons (C), unfed (U), and engorged (T) larvae, nymphs and whole adult females [day-1(d1), day-4 (d4)].

Semi quantitative RT-PCR

In order to obtain the full-length novel MP encoding sequences from these three ticks, several primers were designed (Table 1) based on the full-length MP sequences available for *R. microplus*, *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* in Genbank. RT-PCR was carried out with RNA extracted from various tissues (as shown above) or the total female *I. persulcatus* cDNA library, using forward and reverse primers designed based on the starting and stop codon region to clone the full-length ORFs (open read frames) of MPs (Table 1). After standardization with actin primers, the condition of PCR reaction using Elongase enzyme (Invitrogen) was 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 56 °C for 30 s and 68 °C for 2 min, and a final extension of 68 °C for 5 min. For BrRm-MP1, BrRm-MP2, BrRm-MP4, BrRm-MP5, Ip-MP1 and Ip-MP2, annealing temperature was 58 °C, while for Ip-MP3 55 °C was set. Primers specific for tick actin (Vaz Junior et al. 2005; Konnai et al. 2008) were also designed based on the actin genes (Table 1) and used as positive control to check the cDNA integrity.

Table 1 Primers used in cloning and RT-PCR

Gene	Organism	Primers forward	Primers reverse	Accession number
BrRm-MP1	<i>R. microplus</i>	ATGCGGGTTTTTCATTATACATAITGCA	TCACCAITTCGTGTACTCCGCAGAC	KF874606
Rs-MP1				KF874603
BrRm-MP2		ATGATGACATTCTCTGGGAAATTACAGC	TCATTTCAAGCCACATAATCCCTCGTATG	KF874607
Rs-MP2				KF874604
BrRm-MP3	ATGAAACACACAGTACTCCAATACTTTTCTTG	TTACTCTAAAGACTTCTTAAACTCCCGCTTTG	DQ118969	
BrRm-MP4	TTTTTGCTAGCATGGTCAGTGTGATCATAG TACTCGTGTGCTG	AAAAAGGATCCTTAGTGGTGGTGGTGGTG GTGTTTTTCTTCCCACTGTGTGCCCG	KF874608	
BrRm-MP4 Transcription	GCGGGTGAAGCAATGCAACAAC	TTATTTTTCTTCCCA CCTGTGCCCC		
BrRm-MP5	ATGAAAATCGTTTACGTTGGTGAGCGT	TTACGTGCTTCTGTCTTCTCTCGGGTCTMI	KF874609	
Rs-MP5			KF874605	
Actin primers		TGTGACGACGAGGTTGCCG	GAAAGCACTTGAGGTGGACAATG	AY255624
	<i>I. persulcatus</i>			
Ip-MP1		ATGTCGGGACTGAGCCTGAAATTG	TTAGTCTTCGTGCTTATTTTGATTTCCG	KF874600
Ip-MP1 Transcription		GCCTATCTAGGAACAGCGTGTGCCG	TTAGTCTTCGTGCTTATTTTGATTTCCG	
Ip-MP2	ATGTCGGAACTCAGCCTGAAATGTG	TTAGTCCGTTCTGCTTATTTTGATCCG	TTAGTCCGTTCTGCTTATTTTGATCCG	KF874601
Ip-MP2 Transcription	GCAAACTACAACACTGGGTTGGAGG	TTAGTCCGTTCTGCTTATTTTGATCCG		
Ip-MP3	ATGATGACTATCATTTTGGGGCTCC	TCATTTCCCGGIACGTTCTCTCCG	TTAGTCCGTTCTGCTTATTTTGATCCG	F874602
Ip-MP3 Transcription	ATGATGACTATCATTTTGGGGCTCC	GTTCGTGGGGTGGATGCCG		
Actin		TGGATCGGGGGCTCCATCCT	GAAAGCACTTGCGGTGGACAATG	AB374098

Cloning of MPs

PCR products were separated by electrophoresis in a 0.8 % agarose gel analyzed after staining with ethidium bromide. After confirmation of amplicon size, PCR products (20 μ l) were precipitated using 1 ml absolute ethanol and 40 μ l sodium acetate (3 M, pH 5.2) overnight at -20 °C and then purified using the GeneClean II kit (Qbiogene) according to the manufacturer's instructions. Amplicons were ligated in plasmidial vector pGEM-T (Promega) according to the manufacturer's instructions and resulting plasmids were used to transform *E. coli* Top 10 strain. Plasmidial DNA from positive clones was extracted by alkaline lysis (Sambrook and Russell 2001), and the identities of the products were confirmed by PCR, hydrolysis with restriction enzymes and DNA sequencing.

Sequence analysis

The MPs sequences obtained and identified were used to search for identical MP sequences using Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST) (Altschul et al. 1990) algorithms against NCBI non-redundant protein database, Bm Gene Index (BmiGI), available at DFCI (Guerrero et al. 2005; Wang et al. 2007; Saldivar et al. 2008; Bellgard et al. 2012). The BLAST search assembled several identical MPs sequences that belong to hematophagous arthropods.

Alignment and editing of MP nucleotide and amino acid sequences were performed using BioEdit version 7.0.5.2 (Hall 1999), GeneDoc version 5.10 (Nicholas et al. 1997), MEGA version 5.1 (Tamura et al. 2011) and Vector NTI (Invitrogen). Aligned sequences were shaded and manually corrected in GeneDoc. Aligned sequences were subjected to estimate phylogenetic tree topology using the MEGA software. The bootstrap confidence intervals for each branching pattern were calculated from 1,000 replicates by resampling.

Signal peptides were identified using SignalP 4.0 server (Petersen et al. 2011). For the prediction of molecular weight as well as of the isoelectric point (pI), the ExPASy Proteomics Server (Bjellqvist et al. 1993, 1994; Gasteiger et al. 2005) was used. The NetN-Gly1.0 server (Gupta et al. unpublished) was used to scan the MP putative sequences for N-glycosylation sites. For motifs and domains prediction, the sequences were subjected to ScanProsite (Sigrist et al. 2010). Lasergene version 7.0.0 was used to calculate the predictive antigenicity and hydrophobicity of sequences using the Jameson-Wolf algorithm (Jameson and Wolf 1988). Predictions of deduced trans-membrane-spanning regions were done according to various algorithms described (Hofmann and Stoffel 1993; Hirokawa et al. 1998; Mitaku and Hirokawa 1999; Tusnády and Simon 2001; Mitaku et al. 2002).

Results

Cloning and identification of MPs

Gel electrophoresis shows that only one amplicon was obtained using each primer pair, for each tick species. Amino acid sequences of all amplicons obtained contained a highly conserved zinc-binding site (H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H-D) followed by a Met-turn motif and a cysteine-rich C-terminal motif (Figs. 1, 2). These characteristics constitute the reprotysin signature (Fig. 1); therefore, all sequences obtained belong to the reprotysin family of the metzincin group of MPs.

```

BrRm-MP1 : -----MRVFII LQFAFYSDAEKDAFYPTLLQERSTERNLVLRLNPKFLLNLOR : 50
BrRm-MP2 : MMTFLNGYSVKIRITLLLLAGVVALQENMVVYPRLLLEERGGDDGAMVYSTHGLAANLRK : 60
BrRm-MP4 : MVSVI-----IV VLAIAAGEAMQPRLVYPRLLLEERSADGRMVVHLEKLTENLRK : 51
BrRm-MP5 : -MKSFTLVSAQLLTVIIGCRAAKLPKYRAIT Q FDG D-ENTKVVYINDDISLNLEP : 58
Rs-MP1 : -----MRVFII LQFAFYSDAEKDAFYPTLLQERSTERNLVLRLNPKFLLNLOR : 50
Ip-MP1 : ---MSGLSLKLW---T AFFSFCLAEKEHGIVYPRMLESRAATGERMLKINDDLTLTLQK : 54
Ip-MP2 : ---MSELSLKLW---T AFFSFCLAEKEHGIVYPRMLESRAATGERMLKINDDLTLTLQK : 54
Ip-MP3 : ---MMTIILRLLGFAA AQWSSAFTD-EGALVYPRLLLESRLNEERILKINKDIILKLER : 56
-----♦

BrRm-MP1 : SSVLADKLLFVLTSEVNHLEEIDTSAIQKTLYHDTHYQSSVVRVQQRDDAVQVEGLINDK : 110
BrRm-MP2 : VSVTAPTLLVHEHEGKPIVRVYRGGDDIDENLHEDEKQLATVMVYSITNNALLEGVVGP : 120
BrRm-MP4 : ASVAARNFRVLEQENGREVTHEFNGEDLQODLHEDEKQFASVHVRRRDGGVVEGVVGP : 111
BrRm-MP5 : ISVLHEDFFIRTYRNGIAEHHVHVRELOKDLVHDKKRYAVMLSEEDGTVRVEGVVGTN : 118
Rs-MP1 : SSVLADKLLFVLTSEVNHLEEIDTSAIQKTLYHDTHYQSSVVRVQQRDDAVQVEGLINDK : 110
Ip-MP1 : SKVFADDFLFTTDDGNEPIDYVKAEDAERDIYHDSHTMASVVRVT-DDDGVVEVGLGER : 113
Ip-MP2 : SKVFADDFLFTTDDGNEPIDYVKAEDAERDIYHDSHTMASVVRVT-DDDGVVEVGLGER : 113
Ip-MP3 : TSVFPEKLLIRTHEEGSLVNNVNGSEHNEHLYHDTEKMAAVILK-DDDGVNVEGLRH : 115

BrRm-MP1 : LRKPKVFEGRSMKQQLLHKIYEVNNMNEGSFIAEEKPRKSHIEANVDQNPSPAKPKGVNS : 170
BrRm-MP2 : HRISPAEEMERSEBCHVAHVHEIDEQPNDMFDGLVANRTDKASLLAERQYNY----- : 173
BrRm-MP4 : HRTEPVHTMERSSEBGLAHMHEHEIEMK--DMHDIAVAPIGKGAPTVSERNYGS----- : 162
BrRm-MP5 : LKTRPHEATRSDDGRIHLVENIEEDDSFEVYGVKVEDSIGISERAARSKSGFDR----- : 174
Rs-MP1 : LRKPKVFEGRSMKQQLLHKIYEVNNMNEGSFIAEEKPRKSHIEANVDQNPSPAKPKGVNS : 170
Ip-MP1 : LRVKPLFAMARTSDGLRPHMLYEVDAHENGSRSHDYG----- : 149
Ip-MP2 : LRVKPLFAMARTSDGLRPHMLYEVDAHENGSRSHDYGSPTNTSNTPVESRTGSTKHSM---- : 169
Ip-MP3 : LRTPQMEDLRSLEGHVAHMLFPVKQRTPYRGDGHPPHELRELSYAPEGNTTYNE---- : 171

BrRm-MP1 : RRIEERRNREEFEVLEHLITCQKQHSNFD-KNEDLIGYMAVFMNAANLRYLDIRNPKVRF : 229
BrRm-MP2 : ----YRTVPAEVTVELFVVISDKIHQORFT-QTQRLLSYMCMVNSANLRLQDTSAPRIKL : 228
BrRm-MP4 : ----TQSVPPSVTIELFVVSDRPHRRHFQ-TTIQLIEYCMVNSANLRYADTDSPRVIF : 217
BrRm-MP5 : ----TKYNVYEMFPEVVFVCDSWFQAEFV-KSMNVTVYMIHTSQVVSRYLSALRNPKVYP : 229
Rs-MP1 : RRIEERRNREEFEVLEHLITCQKQHSNFD-KNEDLIGYMAVFMNAANLRYLDIRNPKVRF : 229
Ip-MP1 : ----- : -
Ip-MP2 : ---YKI--PLEIYEVHLLVVDSTFASAKFDVYKVTTRYFAVLTNAANLRYASFEFPKVQL : 224
Ip-MP3 : ---FEERGDQITISPEVHAVLDAATCAAYNYNRKELINYLSVMAMSANLRYKSVTHSVRL : 228

BrRm-MP1 : LVGLITREK---GKFFRSRHSRYTD---TTETLNLRLQAYEAEK-VPGKHALLLVLTGL : 281
BrRm-MP2 : LVGLERVHNAWEEYVYKGGDKYMD---DTATITTLVEHIKTRKHLYGDPDAVYIATGR : 284
BrRm-MP4 : LVIGVEKDE---HSEYRIGNDKYLE---SSNSLEQFRSAYGRHHLFGNPTVFTLITGF : 270
BrRm-MP5 : VLRGIELSTLQOEKKYVYVYLNAAASID---AYKSLKLVTFVTERNDTYQTFMVYVTRY : 286
Rs-MP1 : LVGLITRRK---ENFPAPDNHGTTD---TTETLNLRLQAYEAEK-VPGKHALLLVLTGL : 281
Ip-MP1 : ----- : -
Ip-MP2 : XTCTITMNNKPGDEPIYIHNVKGYEKYRNILFKETLEDFNKQMKSPFYYSIVFLVTAK : 284
Ip-MP3 : TVAVVTLLEN-TQPFLLFKYKGNKD--MVTFHDTLMFFDSYYQDPEFNNAIIFYLLTGL : 285

BrRm-MP1 : DIVKVQNG-HLEKGIAGRFFMAAVCSHGVGVAEDTATTYMGVNTVAHELAILGSDHDT : 340
BrRm-MP2 : DMVYAMDSG-APDTRRKCLFVAGVCTELFWAIGEDNAGSYDGMHALTHEVAHLFLCAAHDG : 343
BrRm-MP4 : DVYSTGNGGSKSTSVLGTGYVGGCTEYFVALGEDSAGLTYGMHTLTHESEGVFLGAAHDE : 330
BrRm-MP5 : DMVAVYDDGSRQNSLQCYAFVGSACKNREQLGEDTAYSRYGIRTMTHLALHALGCSHDG : 346
Rs-MP1 : DIVKVQNG-HLEKGIAGRFFMAAVCSHGVGVAEDTATTYMGVNTVAHELAILGSDHDT : 340
Ip-MP1 : -----YALYLTACSEWRVGMSEDPPTSYYGAYVFAHELARNLGCQHDG : 192
Ip-MP2 : NMS-EWVDGKLQHWVGYAYLGTACSEWRVGMSEDPPTSYYGAYVFAHELARNLGCQHDG : 343
Ip-MP3 : DIVGVATDGLMPHFSYLYLNVKCTVFKVGMAEDEPKSYDGVHLFSHELAILGCAHDE : 345
-----♦

```

Fig. 1 Amino acid sequence comparison of ticks MPs. All MPs were found to possess a signal peptide (in gray and underlined with cut-line). Conserved zinc binding site is underlined with diamond-headed line. The methionine turning motif (MSY) is underlined by a tree. Black and grey indicate 100 and 80–90 % sequence identity, respectively

```

BrRm-MP1 : S-----PRCPWREGMLMSYVDGGLKRYRLSQCQSQDSIRDYRGLNSQKRVL : 387
BrRm-MP2 : DAPKTNIVPGHPGALACFFSQYIMSYVNTGPNYHRFSPCSVVQIRYVMRLRGPLQWQVK : 403
BrRm-MP4 : SRPVS-WIKGDPGMSCLFWEKGGHIMSIVDGGVHHHHSKCSLAQIRNIVILRWGSWLLS : 389
BrRm-MP5 : TAAPGIVTAFPTPDSLQCFWEHGYIMSYYEVDIRSMQSRRCRYDITQRMSWAYEGGLHKN : 406
Rs-MP1 : S-----PRCPWREGMLMSYVDGGLKRYRLSQCQSQDSIRDYRGLNSQKRVL : 380
Ip-MP1 : DGPSD-WVKGHIGSTDCEPDDGMLMSYKMQDEIQYQHSYCCQREVRNLYNRPEFKLRLER : 251
Ip-MP2 : DGPSD-WVKGHIGSTDCEPDDGMLMSYKMQDEIQYQHSYCCQREVRNLYNRPEFKLRLER : 402
Ip-MP3 : DPPDG-TMPGHGPGSQNCFWDDGMLMSYVINFKNHFKISPCCVNSLR--FVAKERKQLYEV : 402

```

▲

```

BrRm-MP1 : TKVNYMDKHRE---EPGETVGVKYYCRKRIFHYTKGKKVAFAPAKGTQDAQNCKMQCC-- : 442
BrRm-MP2 : SQGHKVDGYYPGMLVTPLNICKYKFPREQSVDADTSLAVLRCKVRCRTYSKLRNLNYGR-- : 461
BrRm-MP4 : NTGHTNAGIYPGMEVAPFNAYCRHAFDPKENVTADMESDSMKKCMKQCQYPEYRRVCYSSR : 449
BrRm-MP5 : NSNRFPNLNWT-EYYLPGENLSLNRQCEMKYPQLHGTYYLEKVIDKWYCGYCYVPEVP-- : 464
Rs-MP1 : -----MP-----KIVGCNAAIGKVT----- : 395
Ip-MP1 : YATKTIKRSSK---LPGVMTTLSNYCKRVYMYDEGMHADRTYGVQDCKVKC-TAKT--- : 303
Ip-MP2 : YTTKTIKRSSK---LPGVMTTLSNYCKRVYMYDEGMHADRTYGVQDCKVKC-TAKT--- : 454
Ip-MP3 : NAKNPVENLKS---LPGFRISPTSFQCFMHPLYRGVHSDKAGHSDCIQTCRTAKNRR-- : 457

```

```

BrRm-MP1 : YWQGNMRTCPPTPLERMTCL---KGKTKRGCVGVHEW----- : 478
BrRm-MP2 : --AYKFPVQVEFEAPDARCG--DRTVQIRGICGLK----- : 493
BrRm-MP4 : CFTYVTYSLQLHAQDYMPGCG--GNKVQIQVCGEGEKIVMPSQKSTTVTATADTEATTT : 506
BrRm-MP5 : --GESSAGQDFLFMDGTTCCDDDYAKTHMYKRRVPCREKNRRT-- : 506
Rs-MP1 : ----- : -
Ip-MP1 : -----TYRRLSVVDGTPCG--KKAAILGBCVDEIKISTKD-- : 337
Ip-MP2 : -----THRRLSVVDGTPCG--KKAAILGCKQVDAIKISRTD-- : 488
Ip-MP3 : -----GGYKSTHAAIDGVPCDNRNKKAINKKATLLNSMPERTYRE-- : 500

```

```

BrRm-MP1 : ----- : -
BrRm-MP2 : ----- : -
BrRm-MP4 : TTTTTTPTTATTECRDCSTTASTTQKRPWQRSAPRWPYRSGNRWEEK : 555
BrRm-MP5 : ----- : -
Rs-MP1 : ----- : -
Ip-MP1 : ----- : -
Ip-MP2 : ----- : -
Ip-MP3 : ----- : -

```

Fig. 1 continued

Sequence analysis

The new MP encoding sequences were submitted to GenBank, three from *I. persulcatus* (Ip-MP1, KF874600; Ip-MP2, KF874601; Ip-MP3, KF874602) and *R. sanguineus* (Rs-MP1, KF874603; Rs-MP2, KF874604; Rs-MP5, KF874605) and four from *R. microplus* (BrRm-MP1, KF874606; BrRm-MP2, KF874607; BrRm-MP4, KF874608; BrRm-MP5, KF874609). All BrRm-MPs sequences differed from MPs sequences deposited in GenBank, for the same genes. *R. microplus* (Porto Alegre strain) BrRm-MP1, BrRm-MP2, BrRm-MP4 and BrRm-MP5 differed by 6, 2, 7 and 5 %, respectively, from corresponding *R. microplus* sequences present in GenBank, showing the variation between different *R. microplus* populations. Between *R. microplus* and *R. sanguineus*, BrRm-MP1 and Rs-MP1 are 76 % identical. On the other hand, BrRm-MP2 and BrRm-MP5 are 100 % identical to Rs-MP2 and Rs-MP5, respectively. Similarly, *I. persulcatus* share identities with *I. ricinus* and *I. scapularis* that ranged from 88 to 97 % (Table 2).

All MP identified sequences possess start codon and stop codon regions (Fig. 1) and highly antigenic internal regions (Fig. 3). Using various methods, as described in Materials and methods, we found that each algorithm made a different prediction. The Hofmann and Stoffel (1993) algorithms revealed that only BrRm-MP4 possesses a trans-membrane spanning segment. Contrarily, another method (Hirokawa et al. 1998; Mitaku and Hirokawa

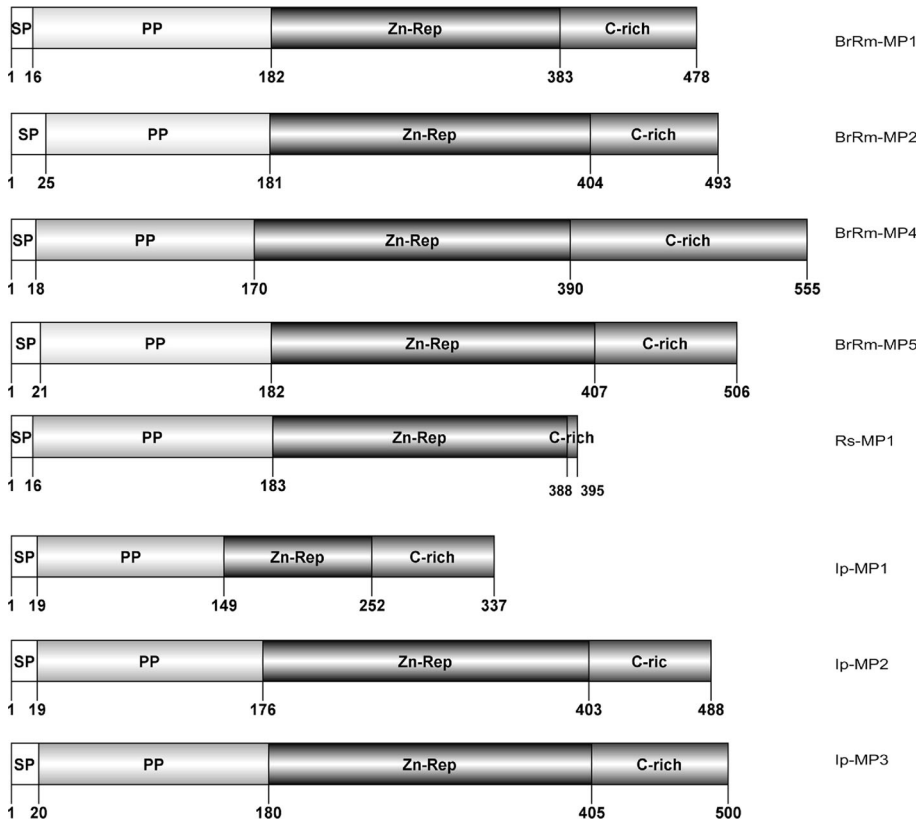


Fig. 2 Schematic presentation of domain structure of MPs. SP: signal peptide at N-terminal site; PP: pro-peptide; Rep: reprolysin domain with zinc-binding motif and Met-turn; C-rich: Cysteine rich domain at the C-terminal tail

1999; Mitaku et al. 2002) predicted that only BrRm-MP5 possess a trans-membrane segment. According to a third algorithm (Tusnády and Simon 2001), no MPs showed any trans-membrane segment. N-glycosylation site predictions suggest that all MPs possess putative N-glycosylation sites, except Ip-MP1. The deduced amino acid sequences of each MP was subjected to BLASTP as probe to scan for other similar sequences present in the NCBI GenBank, tick databases Bmi Gene Index (BmiGI) available at DFCI. Sequences obtained after BLAST indicate that each MP amino acid sequence hits a number of similar sequences from various organisms including: *R. microplus*, *R. pulchellus*, *R. haemaphysaloides*, *I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. pacificus*, *Amblyomma maculatum*, *A. variegatum* and *H. longicornis* (Table 2). Some of these sequences were previously described as tick MPs (Harnnoi et al. 2007; Decrem et al. 2008a, b; Imamura et al. 2009; Barnard et al. 2012). As supposed, Rs-MPs were found to be identical with BrRm-MPs, while Ip-MPs show close identity with *I. ricinus* and *I. scapularis* (Table 2).

Rhipicephalus microplus and *R. sanguineus* MPs

RT-PCR based on the use of forward and reversed primers designed for *R. microplus* MPs led to the amplification of genes coding for three novel MPs in *R. sanguineus* (Rs-

Table 2 Identity matrix (%) of tick MPs

Gene	<i>I. scapularis</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>R. microplus</i>	<i>R. pulchellus</i>	<i>I. pacificus</i>	<i>A. macculatum</i>	<i>H. longicornis</i>	<i>R. haemaphysaloides</i>
BrRm-MP1	31	31	94	52	30	47	42	49
BrRm-MP2	35	34	98	84	28	62	44	44
BrRm-MP4	32	30	93	28	29	29	52	30
BrRm-MP5	37	36	95	51	31	51	43	25
Rs-MP1	33	34	76	26	32	29	45	52
Ip-MP1	89	97	51	51	81	50	53	35
Ip-MP2	93	95	47	46	80	44	43	30
Ip-MP3	88	94	38	36	35	36	32	31

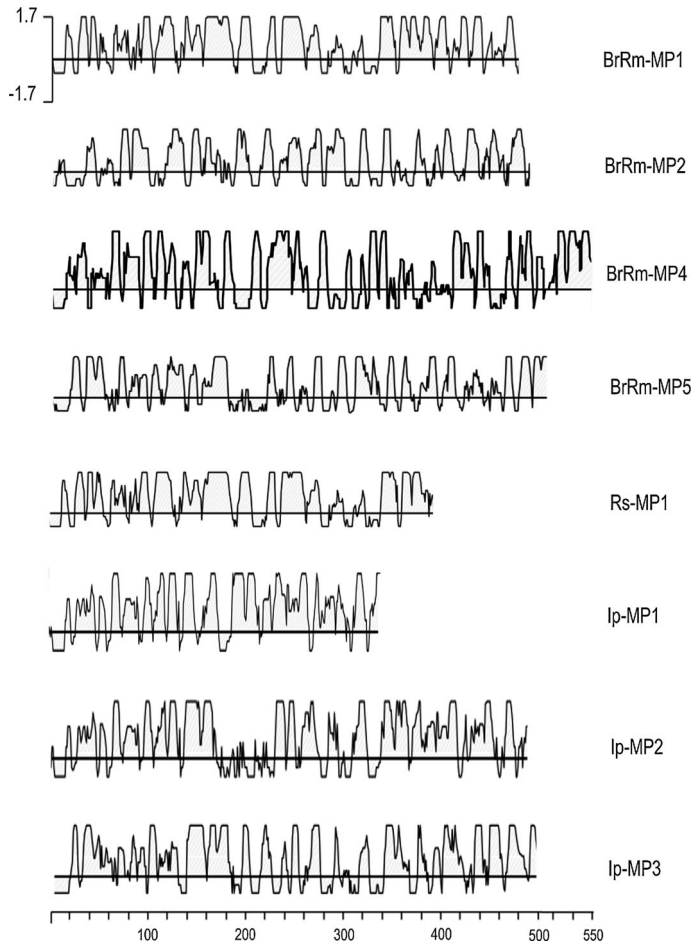


Fig. 3 Schematic representation of average deduced antigenicity of MPs. Antigenic index plots were predicted using the Jameson–Wolf algorithm and the Lasergene software. The *X* axis represents the amino acid number and positive values on the *Y* axis (numbered only for BrRm-MP1) denote deduced antigenicity

MP1, Rs-MP2 and Rs-MP5). *Rhipicephalus microplus* (Porto Alegre strain) amplified MPs were called BrRm-MP1, BrRm-MP2, BrRm-MP3, BrRm-MP4, and BrRm-MP5. Sequence analysis showed that all BrRm-MPs and Rs-MPs contain a signal peptide sequence of 16, 16, 25 and 21 amino acids for Rs-MP1, BrRm-MP1, BrRm-MP2, BrRm-MP5, respectively (Fig. 4). Also, Rs-MP1, BrRm-MP1, BrRm-MP2, BrRm-MP4 and BrRm-MP5 were found to have theoretical MW of 45 kDa (395 aa) 55 kDa (478 aa), 55 kDa (493 aa), 62 kDa (555 aa) and 58 kDa (506 aa) with a calculated isoelectric point of 6.93, 9.12, 6.87, 6.43 and 5.96, respectively. Analyses showed that all sequences have putative N-glycosylation sites. Moreover, a pro-peptide and a reprotolysin signature (zinc binding motif, a Met-turn and a cysteine rich motif) was observed in all MPs. Unfortunately, we were unable to obtain full ORFs for BrRm-MP3 and Rs-MP3 sequences for comparison with other MPs (Fig. 5).

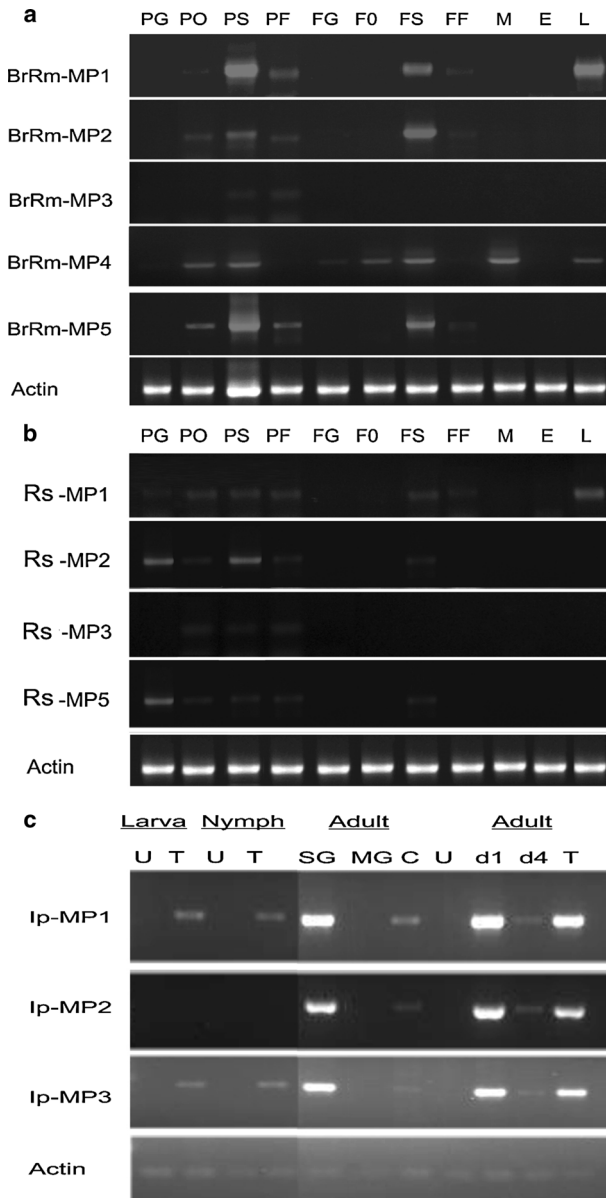


Fig. 4 Transcriptional distribution and mRNA abundance of MPs in various tissues of partially and fully fed *Rhipicephalus* ticks (**a**, **b**), eggs (E), 5-day-old larvae (L) and whole male organism (M). Total RNA of salivary glands (s), midguts (g), ovaries (o) fat bodies (f) of both partially (capital alphabet P) and fully fed ticks (capital alphabet F) were isolated after dissecting ticks and subjected to RT-PCR as described in materials and methods. Transcriptional profile of *Ixodes persulcatus* MPs (**c**) was analyzed in salivary glands (SG), midguts (MG) cytoskeletons (C), unfed (U), and engorged (T) larvae, nymphs and whole adult females [day1 (d1), day4 (d4)]. The actin gene was used as a positive marker

Ixodes persulcatus MPs

RT-PCR based on the use of forward and reversed primers designed for *I. scapularis* and *I. ricinus* MPs led to the amplification of genes coding for three novel MPs in *I. persulcatus*. All three full length MPs encoding ORFs were cloned and named Ip-MP1, Ip-MP2 Ip-MP3. The calculated MW was 38 kDa (337 aa), 55 kDa (488 aa) and 56 kDa (500 aa) for Ip-MP1, Ip-MP2 Ip-MP3, respectively. Theoretical pIs are 5.80, 6.76 and 6.54 for Ip-MP1, Ip-MP2 and Ip-MP3, respectively. Except for Ip-MP1, all MPs were found to possess putative N-glycosylation sites. Like BrRm-MPs and Rs-MPs, Ip-MPs have a signal peptide, a pro-peptide and the reprolysin signature (zinc binding motif) (Figs. 1, 2).

Temporospatial and gender specific distribution of MPs

In order to understand the preliminary role of these MPs in tick physiology, transcriptional profile analysis of Rm-MPs and Rs-MPs was carried out throughout life stages (eggs, larvae, partially fed and fully fed female), several tissues (midgut, ovary, salivary gland and fat body) of fully and partially fed female and male whole body (Fig. 4a, b). Concerning *I. persulcatus*, we analyzed the transcriptional profile in midguts, salivary glands and cytoskeletons of unfed and engorged nymphs, larvae and adult females (Fig. 4c). Semi-quantitative RT-PCR showed that all putative MPs are transcribed in salivary glands in all life stages (except BrRm-MP3 and Rs-MP3, which are transcribed only in partially engorged ticks). In larvae, only BrRm-MP1, BrRm-MP4, Rs-MP1, Ip-MP1 and Ip-MP3 are transcribed. Differently to other MPs, BrRm-MP4 is transcribed exclusively in males and midguts of females in the late feeding stage.

Phylogenetic analysis

A phylogenetic tree was constructed to analyze the evolutionary relationship between tick MPs (Fig. 6). Homology analyses were performed taking the predicted amino acid sequences into account, revealed that MPs cluster in clades belonging to genus *Rhipicephalus* and *Ixodes*. Each BrRm-MP was grouped with homologous MPs that belong to same genus with high bootstrap values. On the other hand, Ip-MPs branched as an isolated clade, showing the difference between *Ixodes* and *Rhipicephalus* ticks.

Discussion

In order to better understand the role of MPs in tick physiology, we investigated the diversity of MPs in three tick species. Indeed, novel salivary MPs were found, three in *R. sanguineus* and *I. persulcatus* each. Additionally, we demonstrate the polymorphism in MPs from geographically distinct *R. microplus* strains. Also *R. microplus*, *R. sanguineus* and *I. persulcatus* MPs distribution in tick tissues and developmental stages were characterized. In *I. scapularis*, the proteolytic activity of salivary MPs on fibrinogen and fibrin suggests that they participate in the mechanisms to maintain blood unclotted and can be related to the hemorrhagic activity of snake venom MPs (Francischetti et al. 2003). In the same way, the inhibition of the expression of MPs by RNAi in *I. ricinus* affects the ability of tick saliva to interfere with host fibrinolysis (Decrem et al. 2008a). Also, tick salivary MPs have been postulated to affect *Borrelia* spp. transmission by *I. scapularis* (Francischetti et al. 2003).

Family	Zinc binding site	Space	Met-turn	
Reprolsin/ADAM/ Adamalysin				
<i>Ip</i> -MP3	HEIAHLLGCAH	D	24	MSY
<i>I ricinus</i>	HEIAHLLGCAH	D	24	MSY
Astacin				
<i>R microplus</i>	HELLHAVGFYH	E	44	MLY
<i>I scapularis</i>	HELLHAVGFYH	E	44	MLY
Matrix MPs/ Matrixin				
<i>I scapularis</i>	HEFGHSLGLSH	S	6	MYP
<i>I scapularis</i>	HEFGHSLGLSH	S	6	MAP
Papplysin				
<i>I scapularis</i>	HEMGHVLGLWH	V	33	MNH
<i>Loa loa</i>	HEIGHILGLWH	V	19	MVT
Eucolycin				
<i>Aedes aegypti</i>	HEIGHTLGLDH	T	6	MFP
<i>Daphnia pulex</i>	HEFGHSLGLGH	T	7	MYP
Serralysin				
<i>Morganella morganii</i>	HEIGHTLGLNH	P	26	MSY
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	HEIGHSIGLEH	P	24	MSY
	△ △ △			

Fig. 5 Alignment of zinc finger regions of metzincin subfamilies in several organisms. Preference was given to ticks and related haematophagous organisms. Blast analyses were carried out according to Joh et al. (2004) and Boldt et al. (2001). The sequences of well-established subfamilies of metzincins were aligned showing the zinc-binding and Met-turn regions. Histidines of the conserved zinc-binding region and glutamic acids are *underlined* by a *tree*. Amino acids in *box* are highly conserved within metzincin subfamilies. The *number* shows amino acid gap between Met-turn and zinc binding region

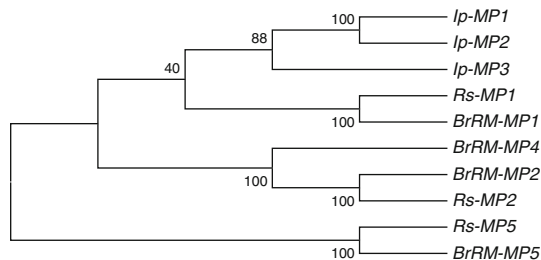


Fig. 6 Phylogenetic tree representation of MP sequences generated by the program MEGA 5.10. The tree was deduced by neighbor joining method based on the alignment of the amino-acid sequences of source homologous MPs from three tick species. Bootstrap values are shown in the *branches*. *Numbers* close to the nodes show the support value for each branch. The identities of MPs description are shown in the tree

Tick salivary proteins undergo abrupt changes in response to attachment and to the initiation of blood meal ingestion (Tikki et al. 1999; Mulenga et al. 2007). Some peptidases are up-regulated to perform the physiological and biochemical functions required for maintenance of tick life (Franta et al. 2010). Assuming that the transcript of a gene in a tissue represents the presence of the corresponding protein, MPs are among those that are up-regulated during early and late phase of tick blood feeding (Adamson et al. 2013). Our results confirm that MPs are transcribed in tick salivary glands throughout blood feeding stages, suggesting that they participate in blood meal. In case of *R. sanguineus*, since MP transcripts were found also in midguts, they may contribute to maintain the ingested blood meal in fluid pool in midgut lumen for further digestion, apart from playing an antimicrobial role (Mazzi et al. 2004). The transcriptional profile of BrRm-MP1, BrRm-MP4, Rs-MP1, Ip-MP1 and Ip-MP3 suggests that they have a role in early developmental stages of tick life, since transcripts were observed also in larvae.

Although differences were observed in *R. microplus* and *R. sanguineus* (BrRm-MP1 and Rs-MP1), two MPs are 100 % identical (BrRm-MP2 and Rs-MP2; BrRm-MP5 and Rs-MP5). Indeed, sequence identity between *R. microplus* and *R. sanguineus* is not rarely observed, since 100 % sequence identities have been found before in ixodid ticks (Ibelli et al. 2013).

We observed differences between BrRm-MPs amino acid sequences and the same *R. microplus* MPs from other geographic regions. Variation in amino acid sequences of the same protein among *R. microplus* from different geographic regions is an important issue, because it can alter vaccine efficacy (García-García et al. 2000). Indeed, a variation greater than 2.8 % in amino acid sequence would be sufficient to modify immunoprotection efficiency (García-García et al. 1999). A variation between 1.14 and 4.56 % was detected in Bm95 amino acid sequence, and a variation ranging from 3.4 to 6.08 % was observed in the amino acid sequence of Bm86. This polymorphism may be responsible for the variable efficiencies of recombinant vaccines derived from the Bm86 and Bm95 proteins in different *R. microplus* strains (Sossai et al. 2005). Differences observed in MP sequences are comparatively similar to those observed in tick cystatins (Parizi et al. 2013) and Bm86 (Sossai et al. 2005) from different geographic areas.

Several peptidases have been shown to participate in ovary development, oogenesis and ovulation. It is well known that MPs that belong to the metzincin clan convert inactive forms of epidermal growth factors produced by human and rodent granulosa cells into biologically active ones (Dong et al. 1999; Liu et al. 1999; Ohnishi et al. 2001; Hinkle et al. 2004; Ben-Ami et al. 2006). Some enzymes of the metzincin clan have strong collagenolytic activity. Therefore, they may also be involved in follicular wall rupture upon hormonal stimulation (Curry and Osteen 2003). BrRm-MPs (except BrRm-MP3) and Rs-MPs transcriptions in ovary strengthen the hypothesis of tick MPs role in reproduction, which includes (a) early activity in ovary development (b) ovulation (c) oogenesis and other parallel functions ticks require for ovary maintenance during the mating period.

Expression of metzincin MPs (matrix MP2) in fat body during all drosophila life stages have been shown to play a key role in remodeling fat cells during metamorphosis (Bond 2010). It is well known that, besides its role as an essential nutrient reservoir for insect metabolism, storing lipids to supply energy throughout development (Locke 1984), the fat body synthesizes several other molecules crucial for tick life. For example, vitellogenin is synthesized and processed in the fat body, released into the hemolymph and incorporated into eggs as the yolk protein, vitellin (RosellDavis and Coons 1989; Umemiya-Shirafuji et al. 2012). MPs transcription in tick fat body suggests that they may play a role in protein processing.

Despite some contradictory results for BrRm-MP4 and BrRm-MP5 obtained using the various algorithms, our results indicate that MPs do not possess a trans-membrane region. This conclusion is compatible with the idea that *H. longicornis* MP is mainly found in the cytoplasm of acini III of salivary glands (Harnnoi et al. 2007). It has been shown that acini III are the main production site of salivary bioactive molecules (Ribeiro and Francischetti 2003). Our results are also compatible with studies that showed that N-glycosylation is essential for MPs processing, resistance to proteolysis, and that it is required for full-enzymatic activity (Escrevente et al. 2008).

In conclusion, we identified MPs in three important tick species and characterized their transcriptional profile in different tissues and developmental stages, which suggests that they have distinct biological functions. These salivary gland MP transcriptional profiles are similar to those of other tick MPs (Harnnoi et al. 2007; Decrem et al. 2008a; Imamura et al. 2009; Barnard et al. 2012). MP transcription in salivary gland is an indication that these enzymes play a role in tick blood meal. These proteins participate in a wide range of biological processes, and their further characterization may open new target antigens for anti-tick vaccine.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the financial support from The World Academy of Sciences (TWAS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, (INCT-EM). Abid Ali is a beneficiary of the TWAS/CNPq doctoral fellowship program.

References

- Adamson SW, Browning RE, Chao CC, Bateman RC, Ching WM, Karim S (2013) Molecular characterization of tick salivary gland glutaminyl cyclase. *Insect Biochem Mol Biol* 43:781–793
- Aljamali M, Bowman AS, Dillwith JW, Tucker JS, Yates GW, Essenberg RC, Sauer JR (2002) Identity and synthesis of prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), as assessed by radioimmunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *Insect Biochem Mol Biol* 32:331–341
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Anisuzzaman Islam MK, Alim MA, Miyoshi T, Hatta T, Yamaji K, Matsumoto Y, Fujisaki K, Tsuji N (2011) Longistatin, a plasminogen activator, is key to the availability of blood-meals for ixodid ticks. *PLoS Pathog* 7(3):e1001312
- Antuch W, Guntert P, Billeter M, Hawthorne T, Grossenbacher H, Wuthrich K (1994) Nmr solution structure of the recombinant tick anticoagulant protein (Rtap), a factor Xa inhibitor from the tick *Ornithodoros-Moubata*. *FEBS Lett* 352:251–257
- Barnard AC, Nijhof AM, Gaspar ARM, Neitz AWH, Jongejan F, Maritz-Olivier C (2012) Expression profiling, gene silencing and transcriptional networking of metzincin metalloproteases in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 186:403–414
- Bastiani M, Hillebrand S, Horn F, Kist TBL, Guimaraes JA, Termignoni C (2002) Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kinase activity. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1439–1446
- Bellgard MI, Moolhuijzen PM, Guerrero FD, Schibeci D, Rodriguez-Valle M, Peterson DG, Dowd SE, Barrero R, Hunter A, Miller RJ, Lew-Tabor AE (2012) CattleTickBase: an integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int J Parasitol* 42:161–169
- Ben-Ami I, Freimann S, Armon L, Dantes A, Ron-El R, Amsterdam A (2006) Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. *Mol Hum Reprod* 12:413–419
- Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez JC, Frutiger S, Hochstrasser D (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino-acid-sequences. *Electrophoresis* 14:1023–1031

- Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE (1994) Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* 15:529–539
- Boldt HB, Overgaard MT, Laursen LS, Weyer K, Sottrup-Jensen L, Oxvig C (2001) Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): classification as a metzincin. *Biochem J* 358:359–367
- Bond ND (2010) The Role of ecdysone signaling in fat-body tissue remodeling and pupal metabolism. Dissertation, University of Nevada Las Vegas
- Bowman AS, Dillwith JW, Sauer JR (1996) Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. *Parasitol Today* 12:388–396
- Brumpt E (1932) Longévité du virus de la fièvre boutonneuse (*Rickettsia conorii* n. sp.) chez la tique *Rhipicephalus sanguineus*. *C R Soc Biol Fil* 110:1199–1209
- Chang C, Werb Z (2001) The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11:S37–S43
- Chmelar J, Calvo E, Pedra JHF, Francischetti IMB, Kotsyfakis M (2012) Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *J Proteomics* 75:3842–3854
- Curry TE, Osteen KG (2003) The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev* 24:428–465
- Dantas-Torres F (2008) The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol* 152:173–185
- Dantas-Torres F (2009) Ticks on domestic animals in Pernambuco. *Northeast Braz Rev Bras Parasitol Vet* 3:22–28
- Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D (2012) Ticks and tick-borne diseases: a one health perspective. *Trends Parasitol* 28:437–446
- Decrem Y, Beaufays J, Blasioli V, Lahaye K, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E (2008a) A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS J* 275:1485–1499
- Decrem Y, Mariller M, Lahaye K, Blasioli V, Beaufays J, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Cerutti M, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E (2008b) The impact of gene knock-down and vaccination against salivary metalloproteases on blood feeding and egg laying by *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol* 38:549–560
- Dong JY, Opreško LK, Dempsey PJ, Lauffenburger DA, Coffey RJ, Wiley HS (1999) Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6235–6240
- Escrevente C, Morais VA, Keller S, Soares CM, Altevogt P, Costa J (2008) Functional role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1780:905–913
- Francischetti IMB (2010) Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon* 56:1130–1144
- Francischetti IMB, Mather TN, Ribeiro JMC (2003) Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)olytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochem Biophys Res Commun* 305:869–875
- Franta Z, Frantova H, Konvickova J, Horn M, Sojka D, Mares M, Kopacek P (2010) Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasit Vectors* 3:119
- García-García JC, Gonzalez IL, Gonzalez DM, Valdes M, Mendez L, Lamberti J, D'Agostino B, Citroni D, Frago H, Ortiz M, Rodriguez M, De La Fuente J (1999) Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol* 23:883–895
- García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, Rodriguez M, Joglar M, Machado H, Gonzalez IL, Valdes M, Mendez L, De La Fuente J (2000) 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
- Dagda RK, Gasanov S, OIII YDL, Rael ED, Lieb CS (2013) Genetic basis for variation of metalloproteinase-associated biochemical activity in venom of the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Biochem Res Int* 2013: Article ID. 251474
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In: Walker JM (ed) *The proteomics protocols handbook*, 2nd edn. Humana Press, New York, pp 571–607
- Ghosh S, Bansal GC, Gupta SC, Ray D, Khan MQ, Irshad H, Shahiduzzaman M, Seitzer U, Ahmed JS (2007) Status of tick distribution in Bangladesh, India and Pakistan. *Parasitol Res* 101:S207–S216

- Gomis-Rüth FX (2009) Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem* 284:15353–15357
- Gray J, Dantas-Torres F, Estrada-Pena A, Levin M (2013) Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick Borne Dis* 4:171–180
- Guerrero FD, Miller RJ, Rousseau ME, Sunkara S, Quackenbush J, Lee Y, Nene V (2005) BmiGI: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochem Mol Biol* 35:585–595
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser Ser* 41:95–98
- Harnnoi T, Sakaguchi T, Nishikawa Y, Xuan XA, Fujisaki K (2007) Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 147:93–101
- Hayasaka D, Ivanov L, Leonova GN, Goto A, Yoshii K, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I (2001) Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. *J Gen Virol* 82:1319–1328
- Hinkle CL, Sunnarborg SW, Loiselle D, Parker CE, Stevenson M, Russell WE, Lee DC (2004) Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADA-M17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family—the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J Biol Chem* 279:24179–24188
- Hirokawa T, Boon-Chiang S, Mitaku S (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14:378–379
- Hofmann K, Stoffel W (1993) TMbase—a database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 374:166
- Horn F, Dos-Santos PC, Termignoni C (2000) *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor from the cattle tick saliva. *Arch Biochem Biophys* 384:68–73
- Ibelli AMG, Hermance MM, Kim TK, Gonzalez CL, Mulenga A (2013) Bioinformatics and expression analyses of the *Ixodes scapularis* tick cystatin family. *Exp Appl Acarol* 60:41–53
- Imamura S, Vaz Junior ID, Konnai S, Yamada S, Nakajima C, Onuma M, Ohashi K (2009) Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from *Haemaphysalis longicornis*. *Exp Appl Acarol* 48:345–358
- Jameson BA, Wolf H (1988) The antigenic index—a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci* 4:181–186
- Joh JH, Kim BG, Kong WS, Yoo YB, Kim NK, Park HR, Cho BG, Lee CS (2004) Cloning and developmental expression of a metzincin family metalloprotease cDNA from oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol Lett* 239:57–62
- Joubert AM, Crause JC, Gaspar ARM, Clarke FC, Spickett AM, Neitz AWH (1995) Isolation and characterization of an anticoagulant present in the salivary-glands of the bont-legged tick, *Hyalomma truncatum*. *Exp Appl Acarol* 19:79–92
- Kang YB, Jang DH (1985) A description with scanning electron microscopy on the tick *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) male and female specimens. *Kisaengchunghak. Chapchi* 2:305–312
- Kearns DB, Bonner PJ, Smith DR, Shimkets LJ (2002) An extracellular matrix-associated zinc metalloprotease is required for dilauroyl phosphatidylethanolamine chemotactic excitation in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 184:1678–1684
- Konnai S, Saito Y, Nishikado H, Yamada S, Imamura S, Mori A, Ito T, Onuma M, Ohashi K (2008) Establishment of a laboratory colony of taiga tick *Ixodes persulcatus* for tick-borne pathogen transmission studies. *Jpn J Vet Res* 55:85–92
- Konnai S, Nishikado H, Yamada S, Imamura S, Ito T, Onuma M, Murata S, Ohashi K (2011) Molecular identification and expression analysis of lipocalins from blood feeding taiga tick, *Ixodes persulcatus* Schulze. *Exp Parasitol* 127:467–474
- Kotsyfakis M, Sa-Nunes A, Francischetti IMB, Mather TN, Andersen JF, Ribeiro JMC (2006) Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem* 281:26298–26307
- Kovalev SY, Mukhacheva TA (2012) Phylogeographical structure of the tick *Ixodes persulcatus*: a novel view. *Ticks Tick Borne Dis* 3:212–218
- Lima CA, Torquato RJS, Sasaki SD, Justo GZ, Tanaka AS (2010) Biochemical characterization of a Kunitz type inhibitor similar to dendrotoxins produced by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acar: Ixodidae) hemocytes. *Vet Parasitol* 167:279–287
- Liu K, Olofsson JI, Wahlberg P, Ny T (1999) Distinct expression of gelatinase A [matrix metalloproteinase (MMP)-2], collagenase-3 (MMP-13), membrane type MMP 1 (MMP-14), and tissue inhibitor of

- MMPs type 1 mediated by physiological signals during formation and regression of the rat corpus luteum. *Endocrinology* 140:5330–5338
- Locke M (1984) The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: King RC, Akai H (eds) *Insect ultrastructure*, vol 2, 1st edn. Plenum Press, New York, pp 151–197
- Mahlaku M (2002) Biochemical investigations into the proteolytic activities in salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi*. Dissertation, University of Pretoria
- Mans BJ, Gaspar ARMD, Louw AI, Neitz AWH (1998) Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp Appl Acarol* 22:353–366
- Maritz-Olivier C, Stutzer C, Jongejan F, Neitz AW, Gaspar AR (2007) Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends Parasitol* 9:397–407
- Mazzi MV, Marcussi S, Carlos GB, Stabeli RG, Franco JJ, Ticli FK, Cintra ACO, Franca SC, Soares AM, Sampaio SV (2004) A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon* 44:215–223
- Mitaku S, Hirokawa T (1999) Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins: hydrophobicity of helical segments and protein length. *Protein Eng* 12:953–957
- Mitaku S, Hirokawa T, Tsuji T (2002) Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane–water interfaces. *Bioinformatics* 18:608–616
- Mohamed TM (2006) Adenosine deaminase from camel tick *Hyalomma dromedarii*: purification and characterization. *Exp Appl Acarol* 40:101–111
- Moraes-Filho J, Pinter A, Pacheco RC, Gutmann TB, Barbosa SO, Gonz ales MA, Muraro MA, Cec lio SR, Labruna MB (2009) New epidemiological data on Brazilian spotted fever in an endemic area of the state of S ao Paulo, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9:73–78
- Mulenga A, Blandon M, Khumthong R (2007) The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. *Exp Appl Acarol* 41:267–287
- Nicholas KB, Nicholas-Jr HB, Deerfield-II DW (1997) GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBASE NEWS* 4:14
- Nienaber J, Gaspar AR, Neitz AWH (1999) Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp Parasitol* 93:82–91
- Ohnishi J, Ohnishi E, Jin M, Hirano W, Nakane D, Matsui H, Kimura A, Sawa H, Nakayama K, Shibuya H, Nagashima K, Takahashi T (2001) Cloning and characterization of a rat ortholog of MMP-23 (matrix metalloproteinase-23), a unique type of membrane-anchored matrix metalloproteinase and conditioned switching of its expression during the ovarian follicular development. *Mol Endocrinol* 15:747–764
- Parizi LF, Githaka NW, Logullo C, Konnai S, Masuda A, Ohashi K, Vaz Junior ID (2012) The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. *Vet J* 194:158–165
- Parizi LF, Githaka NW, Acevedo C, Benavides U, Seixas A, Logullo C, Konnai S, Ohashi K, Masuda A, Vaz Junior ID (2013) Sequence characterization and immunogenicity of cystatins from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks Tick Borne Dis* 4:492–499
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785–786
- Preston SG, Majtan J, Kouremenou C, Rysnik O, Burger LF, Cruz AC, Guzman MC, Nunn MA, Paesen GC, Nuttall PA, Austyn JM (2013) Novel immuno-modulators from hard ticks selectively reprogramme human dendritic cell responses. *PLoS Pathog* 9(6):e1003450
- Ribeiro JMC, Francischetti IMB (2003) Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* 48:73–88
- Ribeiro JMC, Mather TN (1998) *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Exp Parasitol* 89:213–221
- RosellDavis R, Coons LB (1999) Relationship between feeding, mating, vitellogenin production and vitellogenesis in the tick *Dermacentor variabilis*. *Exp Appl Acarol* 7:95–105
- Saldivar L, Guerrero FD, Miller RJ, Bendele KG, Gondro C, Brayton KA (2008) Microarray analysis of acaricide-inducible gene expression in the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Mol Biol* 17:597–606
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Shpynov SN, Rudakov NV, Iastrebov VK, Leonova GN, Khazova TG, Egorova NV, Borisova ON, Preider VP, Bezrukov GV, Fedorov EG, Fedianin AP, Sherstneva MB, Turyshev AG, Gavrillov AP, Tankibaev MA, Fournier PE, Raoult D (2004) New evidence for the detection of *ehrlichia* and *anaplasma* in ixodes ticks in Russia and Kazakhstan. *Med Parazitol (Mosk)* 2:10–14
- Sigrist CJA, Cerutti L, de Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Bulliard V, Bairoch A, Hulo N (2010) PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res* 38:D161–D166

- Sossai S, Peconick AP, Sales-Junior A, Marcelino FC, Vargas MI, Neves ES, Patarroyo JH (2005) Polymorphism of the *bm86* gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol* 37:199–214
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Tikki N, Rhalem A, Sadak A, Sahibi H (1999) Female tick *Hyalomma marginatum marginatum* salivary glands: preliminary study on protein changes during feeding process and antigens recognized by repeatedly infested cattle. *Parasite* 6:303–309
- Tusnády GE, Simon I (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17:849–850
- Umemiya-Shirafuji R, Boldbaatar D, Liao M, Battur B, Rahman MM, Kuboki T, Galay RL, Tanaka T, Fujisaki K (2012) Target of rapamycin (TOR) controls vitellogenesis via activation of the S6 kinase in the fat body of the tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Int J Parasitol* 42:991–998
- van de Locht A, Stubbs MT, Bode W, Friedrich T, Bollschweiler C, Höffken W, Huber R (1996) The ornithodorin–thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *EMBO J* 15:6011–6017
- Vaz Junior ID, Imamura S, Nakajima C, de Cardoso FC, Ferreira CAS, Renard G, Masuda A, Ohashi K, Onuma N (2005) Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding for *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* actins. *Vet Parasitol* 127:147–155
- Wang MH, Guerrero FD, Perteua G, Nene VM (2007) Global comparative analysis of ESTs from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Genomics* 8:368
- Wuritu, Ozawa Y, Gaowa, Kawamori F, Masuda T, Masuzawa T, Fujita H, Ohashi N (2009) Structural analysis of *ap44/msp2* expression site of *Anaplasma phagocytophilum* in naturally infected ticks in Japan. *J Med Microbiol* 58:1638–1644
- Zhu K, Bowman AS, Brigham DL, Essenberg RC, Dillwith JW, Sauer JR (1997) Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). *Exp Parasitol* 87:30–38

4. Capítulo 2

Artigo 2. Submitido para periódico “*Veterinary Parasitology*”.

1 **Title:**

2 **Immunoprotective potential of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***
3 **metalloprotease**

4 **Authors:** Ali, Abid^{1,2,3}, Parizi, Luís Fernando¹, Guizzo, Melina Garcia¹, Tirloni, Lucas¹,
5 Seixas, Adriana^{1,4}, Vaz Junior, Itabajara da Silva^{1,5}, Termignoni, Carlos^{1,2}

6 **Affiliations:**

7 ¹ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento
8 Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil.

9 ² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro
10 Barcelos, 2600, Porto Alegre 90035-000, RS, Brazil.

11 ³ Institute of Biotechnology Genetic Engineering, The University of Agriculture,
12 Peshawar, 25130, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan.

13 ⁴ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde
14 de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite 245, Porto Alegre 90050-170, RS, Brazil.

15 ⁵ Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento
16 Gonçalves, 9090, Porto Alegre 91540-000, RS, Brazil.

17 Correspondence address: Carlos Termignoni; Centro de Biotecnologia, Universidade
18 Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, 91501-970 Porto
19 Alegre, RS, Brazil.

20 Corresponding author: Carlos Termignoni

21 Tel: + 55 (51) 33086082; Fax + 55 (51) 33087309

22 **E-mail address:** trmgn@cbiot.ufrgs.br

23 **Keywords:** Anti-tick vaccine; *Rhipicephalus*; Salivary gland; Metzincin metalloprotease;
24 Blood meal.

25

26 **Abstract**

27 Ticks have serious impacts on animal and human health, causing significant
28 economic losses. Besides damages due the hematophagous behavior, they also transmit
29 several pathogens. Low cost and environmental safety have made vaccines a promising
30 alternative control method against tick infestation. Metalloproteases (MPs) have been
31 shown to be essential for diverse biological functions in hematophagous organisms,
32 inhibiting blood clotting, degrading extracellular matrix proteins, and inhibiting host tissue
33 repair via anti-angiogenic activity. In this work we analyzed the immunoprotective
34 potential of a recombinant MP against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation.
35 First, a cDNA encoding *R. microplus* amino acids sequence with highly conserved regions
36 of the metzincin (reprolysin) group of MP was identified (BrRm-MP4). After expression
37 and purification, recombinant BrRm-MP4 was used as a vaccinal antigen against *R.*
38 *microplus* infestation in cattle (*Bos taurus taurus*). All vaccinated bovines developed
39 immune response to the antigen, resulting in increased antibody level throughout the
40 immunization protocol. Immunization with rBrRm-MP4 reduced tick feeding success,
41 decreasing the number of engorged females and their reproduction potential, representing
42 a 60% overall protection. Also, Western blot analysis using anti-BrRm-MP4 sera
43 demonstrated the presence of BrRm-MP4 in *R. microplus* salivary glands, larva and ovary
44 tissues. These results show that rBrRm-MP4 provides protection against tick infestation,
45 placing it is a potential candidate for an anti-tick vaccine.

46 **Introduction**

47 The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* affects cattle directly, by
48 blood exploitation, and indirectly, as a vector of several pathogens. In veterinary medicine,
49 *R. microplus* is one of the most important ectoparasites worldwide, causing considerable
50 economic losses (Rechav, 1992; Grisi et al., 2013). Acaricides are the main components of
51 integrated tick control strategies, in spite of the drawbacks associated with the use of these
52 chemicals, like the selection of acaricide-resistant tick populations and risks of
53 contamination by drug residues in dairy and meat products (Graf et al., 2004; de la Fuente
54 and Kocan, 2006; Bissinger and Roe, 2010; Hajdusek et al., 2010). In this scenario, anti-
55 tick vaccines have emerged as an alternative tool to control tick infestation (Rodriguez-
56 Mallon et al., 2012; de la Fuente et al., 1999; de la Fuente et al., 2007). The potential
57 advantages of a vaccine-based control strategy are several, such as cost-effectiveness,
58 avoidance of environmental contamination, prevention of drug-resistance, possibility to
59 prevent pathogen transmission, and potential applicability in a wide variety of hosts (de la
60 Fuente et al., 1999; Graf et al., 2004; de la Fuente et al., 2007; Rodriguez-Mallon et al.,
61 2012).

62 In the development of an anti-tick vaccine, the first step is the identification of
63 efficacious antigens (Willadsen, 2004). With that in mind, various approaches have been
64 developed to obtain an effective vaccine against *R. microplus*. The first attempts were
65 made around 60 years ago, with the use of complex tick extracts (Willadsen, 2006;
66 Sonenshine et al., 2006). Thirty years later, the glycoprotein Bm86, a tick gut epithelial
67 cell protein (Rand et al., 1989; Muhammad et al., 2008), became the first tick antigen used
68 in a commercial vaccine (Willadsen, 2004; de la Fuente et al., 2007). Since this antigen
69 does not confer enough protection against several *R. microplus* populations (Garcia-Garcia

70 et al., 2000; Cunha et al., 2012), the search for new recombinant proteins for an anti-tick
71 vaccine took a strong impetus (Willadsen, 2004; Guerrero et al., 2012). Potential candidate
72 antigens in the composition of a vaccine against *R. microplus* include proteins with a role
73 in several physiological process regulations (Willadsen et al., 1996; Parizi et al., 2012a; de
74 la Fuente and Merino, 2013). Our research group is also investigating the vaccine potential
75 of a number of tick proteins involved in different physiological roles, like cell
76 detoxification and egg development (Leal et al., 2006; Seixas et al., 2008; Parizi et al.,
77 2011; Parizi et al., 2012b). Although several antigens have been tested for their anti-tick
78 efficacy (de la Fuente et al., 1999; Guerrero et al., 2012), only a few have yielded
79 promising results (Patarroyo et al., 2002; Hajdusek et al., 2010; Almazan et al., 2010; de la
80 Fuente and Merino, 2013).

81 Metalloproteases (MPs) are multifunctional proteins that participate in diverse
82 biological functions in several organisms, regulating complex physiologic and pathologic
83 processes (Kessenbrock et al., 2010). A considerable number of studies have been
84 specifically conducted to identify and characterize metzincin MPs. Metzincin MPs
85 members have been found to participate in tissue development, maintenance, remodeling,
86 and in unspecific protein degradation of intake proteins (Gomis-Ruth, 2009; Rivera et al.,
87 2010). It has been speculated that the cysteine-rich domain in MPs is a limiting factor in
88 the production of these proteins by prokaryotes (Ramos and Selistre-De-Araujo, 2006),
89 since a native-like conformation of recombinant MPs is supposed to be critical — as far as
90 retaining immunogenic properties is concerned. In various tick species, MPs have been
91 identified and are considered crucial for maintenance of blood meal related functions
92 (Francischetti et al., 2003; Harnnoi et al., 2007; Decrem et al., 2008a; Barnard et al.,
93 2012). The up-regulation of MPs transcription in salivary glands has been correlated with

94 tick blood feeding (Francischetti et al., 2003; Harnnoi et al., 2007; Decrem et al., 2008a,
95 2008b; Barnard et al., 2012; Adamson et al., 2013). In *Ixodes scapularis*, MPs are secreted
96 in saliva, playing an essential role in fibrin and fibrinogen breakdown (Francischetti et al.,
97 2003). Inhibition of MPs expression in *Ixodes ricinus* by interference RNA (iRNA)
98 prevents tick blood meal completion and inhibits saliva fibrinolytic activity (Decrem et al.,
99 2008a, 2008b). Host vaccination with an *I. ricinus* recombinant MP impairs blood meal
100 completion, and reduces tick weight gain and oviposition rates (Decrem et al., 2008b). In
101 *Haemaphysalis longicornis*, six MPs were identified, one of which was shown to be a
102 potentially interesting immunoprotective antigen (Harnnoi et al., 2007; Imamura et al.,
103 2009).

104 Despite the characterization of some tick MPs (Francischetti et al., 2003; Harnnoi
105 et al., 2007; Decrem et al., 2008a, 2008b; Barnard et al., 2012; Adamson et al., 2013),
106 vaccination trials against *R. microplus* infestation using these proteins as antigen remains
107 to be evaluated. Recently, we characterized several MP putative sequences in three tick
108 species (Ali et al., 2014). Among them, a *R. microplus* MP (BrRm-MP4) was selected for
109 further investigation concerning its potential as a vaccinal antigen, due to its ubiquitous
110 transcriptional pattern among *R. microplus* tissues and an amino acid sequence putatively
111 highly antigenic, as compared to other MPs. Here, we show that vaccination of bovines
112 with a rBrRm-MP4 reduces *R. microplus* infestation and native MP is identified in tick
113 salivary glands, ovary and larva, underlining the prospect that this recombinant antigen is
114 a potential candidate in the development of a feasible vaccine.

115

116

117 **Material and methods**

118 **Ticks**

119 All *R. microplus* ticks (Porto Alegre strain) were free from *Babesia spp.* and
120 *Anaplasma spp.*, and sensitive to all acaricides currently marketed. The colony has been
121 maintained in experimentally infested Hereford calves (*Bos taurus taurus*) since 1976.
122 Calves were purchased from a naturally tick-free area (Santa Vitória do Palmar, RS,
123 Brazil; 33°32'2"S, 53°20'59"W) and maintained in an isolated stall at the Universidade
124 Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Brazil, to avoid infestation by other ticks.
125 Calves were handled following the institutional guidelines approved by local ethical
126 committees for animal use. After repletion on the host, engorged adult female ticks were
127 collected and kept in Petri dishes at 28 °C and 85% relative humidity for oviposition and
128 egg hatching.

129 **Tissue extraction**

130 Partially fed and fully fed ticks were washed with cold 20 mM phosphate, 150 mM
131 NaCl (PBS), pH 7.4, before dissection using a scalpel blade, and any host contaminating
132 tissue was removed using surgical forceps. Ticks were put in a Petri dish containing cold
133 PBS placed under a stereomicroscope. After removal of the dorsal surface, salivary glands
134 and ovary were carefully separated and added to cool PBS. Larvae were macerated using a
135 mortar and a pestle in liquid nitrogen. These preparations were maintained at -70 °C for
136 further use. Proteins were extracted from tissue preparation as previously described (de
137 Lima et al., 2002; Parizi et al., 2011). Protein concentrations were determined according to
138 the Bradford method (Bradford, 1976) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel
139 electrophoresis (SDS-PAGE) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

140

141 **Cloning**

142 Total RNA was extracted from 15-day-old larvae after hatching by using TRIzol
143 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was
144 synthesized from five micrograms of total RNA submitted to reverse transcription (RT)
145 with SuperScript II (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. PCR
146 amplification was performed using primers designed for a sequence from *R. microplus*
147 salivary glands metalloprotease deposited in GenBank (accession number: DQ118970).
148 The forward (5'-TTTTTGCTA GCATG GTCAGTGTGATCATAGTACTCGTGCTG-3')
149 and reverse (5'-AAAAAGGATCCTTAGTGG TGGTGGTGGTGGTGTTTTTCTTCCC
150 ACCTGTTGCCCG-3') primers were designed in order to introduce *Nhe* I and *Bam*H I
151 sites in the sequence for subsequent cloning into expression vector, in addition to a His-tag
152 DNA sequence downstream the BrRm-MP4 ORF. A 1,665-bp amplicon was generated in
153 a 35-cycle PCR reaction (94 °C for denaturation, 55 °C for annealing and 68 °C for
154 extension) using Elongase (Invitrogen). The PCR fragment obtained was separated by
155 electrophoresis on 0.8% agarose gel and purified using the GeneClean II Kit (Qbiogene).
156 The amplicon was cloned in a pGEM-T vector (Promega), transformed into *Escherichia*
157 *coli* Top 10 strain and plated on Luria-Bertani (LB) agar plates containing ampicillin (50
158 µg/mL ampicillin). Correctness of plasmid construction was confirmed by PCR,
159 hydrolysis with restriction enzymes and DNA sequencing. The pGEM-T/BrRm-MP4 was
160 digested with *Nhe* I and *Bam*H I restriction enzymes, and the resulting fragment was
161 ligated into the expression vector pET-5a. The plasmid pET-5a/BrRm-MP4 was purified
162 and cloned product correctness was confirmed by PCR, digestion with restriction enzymes
163 and DNA sequencing.

164

165 **BrRm-MP4 Expression**

166 *Escherichia coli* (RIL) cells were transformed with pET-5a/BrRm-MP4 and plated
167 on to LB agar plates containing 100 µg/mL ampicillin. A single colony containing the
168 plasmid was used to inoculate 25 mL LB broth (100 µg/mL ampicillin) and grown
169 overnight at 37 °C. After removal of medium by centrifugation at 5,000 g for 5 min, the
170 pellets were re-suspended in 500 mL of fresh LB broth and incubated at 37 °C until OD₆₀₀
171 reached 0.4. Expression was induced with isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)
172 at 1 mM final concentration and bacteria were collected after 4 h of bacterial growth.

173 **Purification of recombinant BrRm-MP4**

174 Induced cells from a 500 mL culture were harvested by centrifuging at 10,000 g for
175 10 min at 4 °C. The pellet was re-suspended in 20 mL of PBS, pH 7.4, containing 1
176 mg/mL lysozyme (Invitrogen) and incubated for 1 h at 33 °C. Cells were harvested from
177 the culture by centrifugation and subjected to three freeze/thaw cycles. Cell debris were
178 removed by centrifugation (12,000 g for 20 min), and the supernatant was collected. The
179 pellet was washed with equilibrium buffer (PBS, 30 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH
180 7.4), centrifuged at 10,000 g for 10 min and the supernatant containing rBrRm-MP4 was
181 collected. This process was repeated twice for complete extraction of the recombinant
182 protein. The supernatant was filtered through a 0.45-µm porosity filter (Millipore) and
183 applied onto a 1 mL HisTrap Ni⁺² affinity column (GE Healthcare), previously washed
184 with distilled water and equilibrated with equilibrium buffer. After sample application,
185 unspecific bound proteins were removed washing the column with 15 mL of equilibrium
186 buffer. The recombinant protein was eluted using two phosphate (20 mM) buffers
187 containing imidazole (100 mM or 500 mM), 0.5 M NaCl, pH 7.4. The eluted samples were

188 dialyzed against PBS, pH 7.4 and protein concentrations were determined according to the
189 Bradford method (Bradford, 1976).

190 To confirm protein homogeneity, purification steps were monitored by 12 % SDS-
191 PAGE and Western blot by using a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. The
192 membrane was blocked with skim milk in PBS and subsequently incubated with anti-His
193 tag IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich). The membrane was
194 washed with PBS and incubated with nitroblue tetrazolium (NBT, Fermentas) and 5-
195 bromo, 4-chloro, 3-indolylphosphate (BCIP, Fermentas) to visualize the reaction.

196 **Vaccination trial**

197 Seven calves (18 months old) were randomly divided into two groups of three
198 (control) and four (immunized) animals. The treated group was vaccinated with doses
199 composed of 1 mL of oil adjuvant (Montanide 888 - Seppic and Marcol 52- Exxon Mobil
200 Corporation) plus 1 mL of PBS containing 100 µg of purified rBrRm-MP4 in the first and
201 in the second doses, and 200 µg in the third and in the fourth doses. The control group was
202 injected four times with 1 mL of PBS emulsified with 1 mL of the same adjuvant. Calves
203 were vaccinated subcutaneously at 15-day intervals. Ten days after the fourth injection, 1
204 g *R. microplus* eggs (approximately 20,000 tick larvae) were placed on the dorsal region
205 of each calf. From day 20 after infestation until the end of adult feeding period, all tick
206 females that had dropped from the host were collected, counted and weighed. Engorged
207 adult female ticks were kept in Petri dishes at 28 °C and 85% relative humidity to
208 oviposition and further egg hatching. Protection was estimated comparing the number of
209 fully engorged ticks, egg laying capacity and egg fertility in vaccinated and non-
210 vaccinated calves (Vaz et al., 1998).

211 **Serological analysis**

212 Blood samples were collected from the jugular vein of pre-immunized and post-
213 immunized cattle on the immunizations or tick challenge days. Blood was also collected at
214 the end of tick infestation period. The sera were separated from blood after clot formation
215 by centrifugation at 5,000 g for 10 min at 4 °C and stored at -20 °C for further analysis.
216 The sera obtained from both immunized and control animals were analyzed by Western
217 blot to determine the presence of anti-rBrRm-MP4 antibodies. Purified rBrRm-MP4 was
218 subjected to 12% SDS-PAGE and transferred to a (PVDF) membrane and then blocked
219 with skim milk for 1 h. After blocking with milk blot, membranes were incubated
220 overnight with different concentrations of calf serum pre-incubated with *E. coli* lysate
221 (Ferreira et al., 2002). The membrane was washed three times with milk blot and then
222 incubated with peroxidase-conjugated anti-bovine IgG (Sigma-Aldrich) as secondary
223 antibody for 1 h in a 1:5,000 skim milk dilution. After incubation with the secondary
224 antibody, membranes were washed three times with PBS and incubated with 30 mL PBS
225 containing 15 mg 3-3' diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich), 60 µL of 30% H₂O₂ and
226 900 µL of 1% cobalt chloride (Sigma-Aldrich) to visualize positive signals.

227 **RmBr-MP4 in tick tissues**

228 Sera of rRmBr-MP4 immunized calves (1:50) were used to detect the presence of
229 native RmBr-MP4 in partially and fully fed *R. microplus* salivary glands, ovary and larva
230 (5 days old) by Western blot. Tissue preparations were submitted to 12 % SDS-PAGE and
231 transferred to a PVDF membrane. After blocking with skim milk, the membrane was
232 subsequently incubated with anti-rRmBr-MP4 sera as primary antibodies. The membrane
233 was washed with skim milk and incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-

234 bovine IgG (1:2,000) at 4 °C overnight. To visualize the results, NBT and BCIP were used
235 as mentioned above.

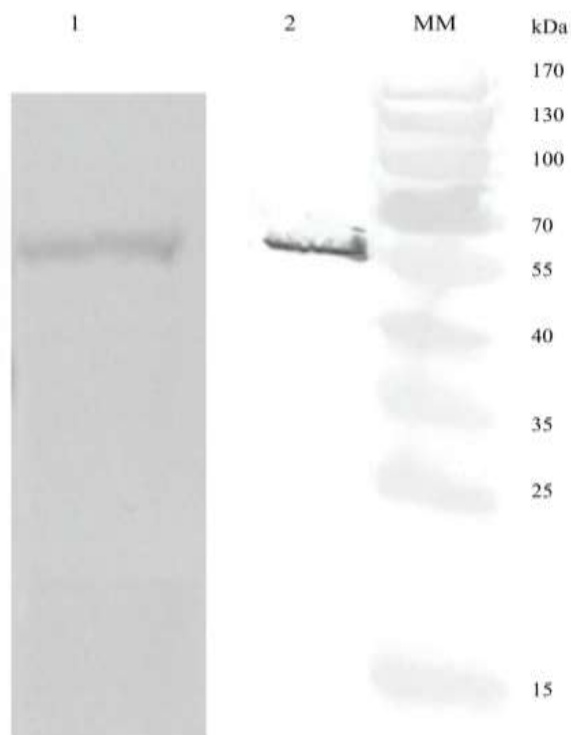
236 **Statistical Analysis**

237 Vaccine efficacy was estimated based on the difference in number and weight of
238 fully engorged ticks, egg laying capacity and egg fertility between vaccinated and non-
239 vaccinated calves. The overall protections were calculated as previously described
240 (Willadsen et al., 1996) by the interrelationship of these parameters using the equation:
241 $100 \times [1 - (NFE \times WE \times WL)]$, where NFE, WE and WL are the number of fully
242 engorged females, egg laying capacity and egg fertility from vaccinated cattle/control
243 cattle, respectively. Significant differences were determined using the t-test.

244 **Results**

245 **Expression and purification of rBrRm-MP4**

246 rBrRm-MP4 expressed in *E. coli* was mostly produced as inclusion bodies and
247 recovered in the insoluble fraction of cell lysate. After solubilization and affinity
248 chromatography steps, rBrRm-MP4 was obtained as a homogeneous protein (Fig. 1) with
249 a final yield of 500 µg/L of growth medium. The apparent size of the recombinant protein
250 is in accordance with its *in silico* predicted molecular mass of 62 kDa (Fig. 1).



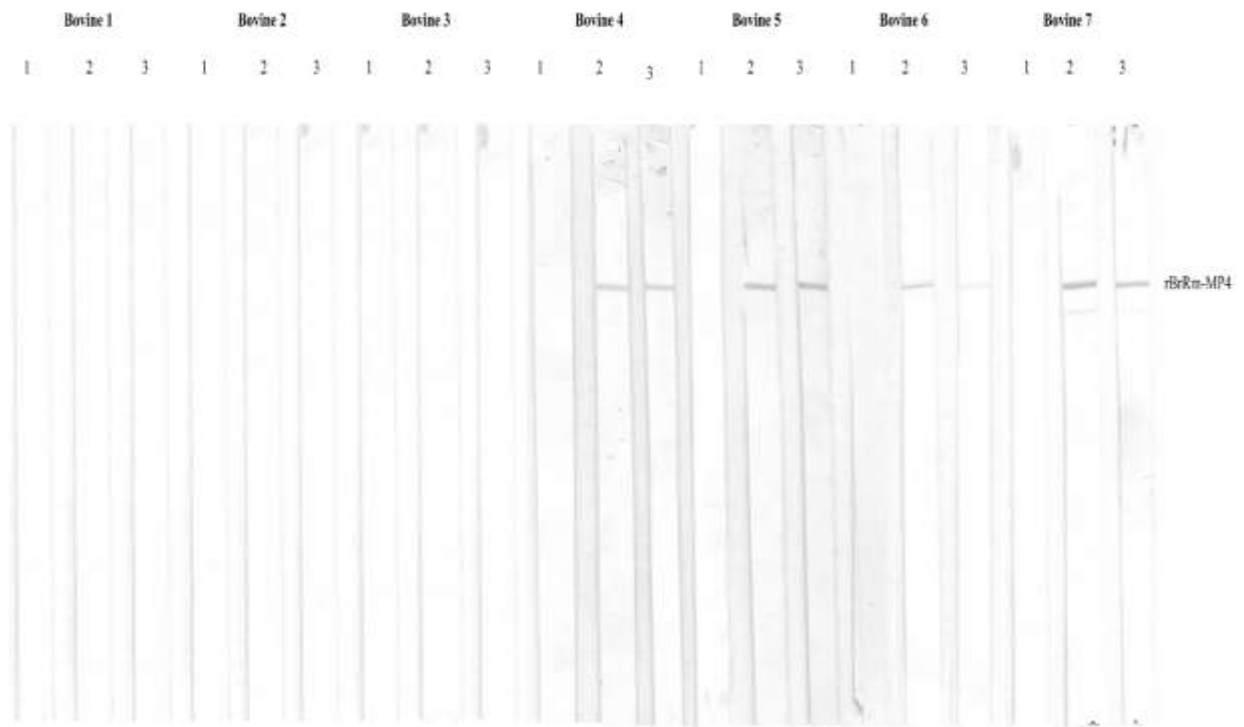
251

252 **Fig.1.** SDS-PAGE and Western blot analysis: (1) 12% SDS-PAGE of 5 μ g of rBrRm-MP4
 253 purified after Ni²⁺ affinity column chromatography. (2) Western blot of 5 μ g of rBrRm-
 254 MP4 probed by using anti-His tag antibodies. Molecular mass marker (MM). Molecular
 255 mass standards are expressed as kDa.

256 **Immunogenicity analysis**

257 Immunogenic analysis of rBrRm-MP4 was performed using bovine sera from
 258 vaccinated and control groups (Fig. 2). Western blot analysis did not detect antibodies
 259 against rBrRm-MP4 in pre-immune sera and sera of control calves. In the immunized
 260 group, an increase in rBrRm-MP4 antibody level was observed after the second
 261 inoculation, and both third and fourth boosters resulted in a further rise in anti-rBrRm-
 262 MP4 antibodies. High antibody level against rBrRm-MP4 was observed in all immunized

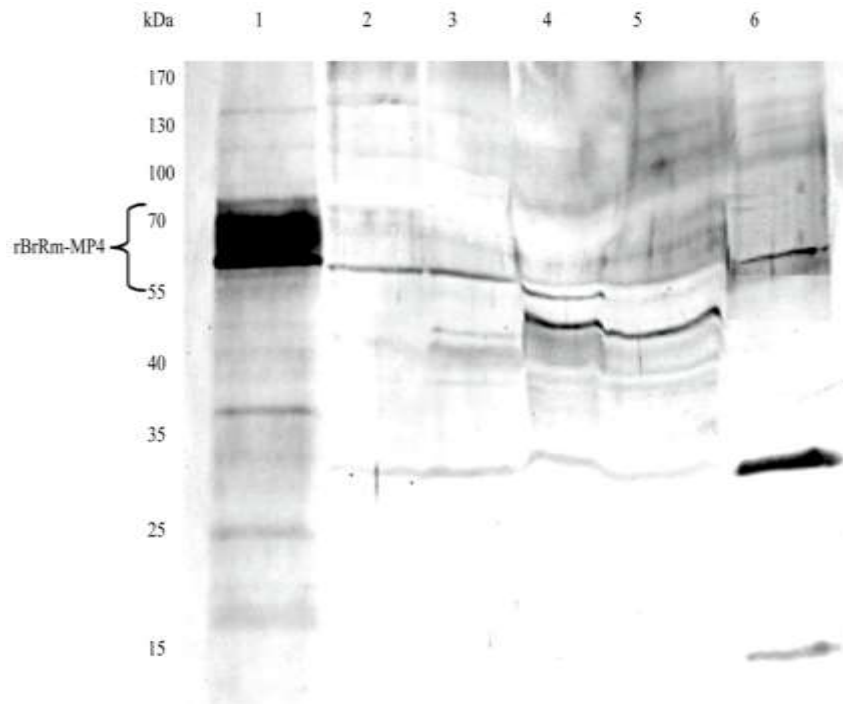
263 animals after the fourth immunization, and remained high until the end of tick infestation
264 (Fig. 2).



265

266 **Fig.2.** Western blot analysis of rBrRm-MP4 probed with immunized bovine sera. Sera
267 from control group (calves 1-3) and rBrRm-MP4 vaccinated group (calves 4-7). Lane 1,
268 pre-immune sera; lane 2, pre-infestation sera; lane 3, post-infestation sera.

269 Western blot analyses revealed that native RmBr-MP4 was recognized in larva,
270 ovary and salivary glands using immunized calf sera (Fig. 3). This suggests that the
271 antibodies induced by rRmBr-MP4 immunization recognize native *R. microplus* MP in
272 different tick tissues.



273

274 **Fig.3.** Western blot analysis of RmBr-MP4 in *R. microplus* salivary glands, ovary and
 275 larva extracts detected with a pool of anti-rRmBr-MP4 sera from the vaccinated group.
 276 Lane 1, rBrRm-MP4; lane 2, fully fed tick salivary gland; lane 3, partially fed tick salivary
 277 gland; lane 4, fully fed tick ovary; lane 5, partially fed tick ovary; lane 6, larva; kDa,
 278 Molecular mass standards.

279 **Vaccine efficacy**

280 The number of engorged female ticks, egg laying capacity and egg fertility were
 281 used to estimate vaccination effectiveness. The results of these biological parameters for
 282 tick infestation on control and vaccinated bovines are shown in Table 1. Vaccination with
 283 rBrRm-MP4 significantly decreased tick number and egg hatching by 42.9% and 14.8%,
 284 respectively. Egg laying capacity was affected approximately by 17.5%, with an overall
 285 afforded protection of 60% against tick infestation.

286

287 **Table 1**

288 Biological parameter of detached *R. microplus* from rBrRm-MP4 vaccinated and control
 289 cattle groups.

Groups	Animals	Fully engorged ^a		Index	
		Number	Weight (g)	Eggs laying capacity ^b	Eggs fertility ^c
rBrRm-MP4	1	1069	309	0.420	0.280
	2	1801	537	0.323	0.274
	3	908	267	0.439	0.324
	4	2409	650	0.346	0.294
Total		6187	1762	1.53	1.172
Mean		1547	441	0.38	0.293
SD		694	183	0.06	0.022
Control	5	3061	811	0.396	0.355
	6	2099	589	0.497	0.325
	7	2965	858	0.453	0.386
Total		8125	2258	1.35	1.066
Mean		2708	753	0.45	0.355
SD		530	144	0.05	0.031
Difference ^d		42.89*	41.46*	14.80	17.53*

290 ^a Female ticks detached during infestation period.

291 ^b The eggs weight laid by sample of fully engorged tick during infestation period was used
 292 to calculate the proportion of the weight of ticks that was converted into eggs.

293 ^c Eggs fertility (Laid eggs converted into larvae).

294 ^d Difference (%) = $100 \times (1 - \text{mean value of vaccinated group} / \text{control group})$.

295 * Statistically significant (p<0.05).

296

297

298

299

300

301 Discussion

302 The cattle tick *R. microplus* is an obligate hematophagous ectoparasite, and it is a
303 major impediment for cattle production in many several countries. Worldwide tick control
304 relies primarily on the use of chemical acaricides, although several studies have been
305 dedicated to investigate the potential of vaccines as an alternative approach (Willadsen,
306 2004; Guerrero et al., 2012; de la Fuente and Merino, 2013). There is ample evidence
307 showing that vaccination with defined proteic antigens is able to induce significant
308 immunity against tick infestation (Willadsen, 2004). Development of tick resistance
309 against vaccine antigens is less probable than resistance against chemical acaricides,
310 because numerous different antibodies are usually generated against multiple antigen
311 epitopes (Hajdusek et al., 2010). The demonstration that recombinant forms of the protein
312 Bm86 confer protection against *R. microplus* infestations was a major achievement in
313 parasite vaccinology, proving that a vaccine to protect against an ectoparasite is indeed a
314 realistic possibility (Rand et al., 1989; Rodriguez et al., 1994; Rodriguez et al., 1995).
315 Indeed, a Bm86-based tick vaccine was the first ectoparasite vaccine available in the
316 market (Rodriguez et al., 1994) (Rodriguez et al., 1994). However, trials conducted in
317 Brazil showed that vaccines based on this antigen alone were unable to control *R.*
318 *microplus* (Cunha et al., 2012). Notably, a vaccine produced with Bm95, a Bm86-
319 homologous protein, offered protection against the Argentinian *R. microplus* strain A,
320 which is insensitive to Bm86-based vaccines (Garcia-Garcia et al., 2000). Limitations
321 associated with the Bm86 vaccines also included limited efficacy against non-
322 *Rhipicephalus* tick species, reinforcing the need to pursue new vaccines (de la Fuente and
323 Merino, 2013).

324 Prolonged tick attachment and subsequent blood feeding on vertebrates host relies
325 on many bioactive molecules secreted by salivary glands. This cocktail of
326 pharmacologically active molecules also facilitates pathogen transmission, which lends
327 support to their use as potential candidates for anti-tick vaccines that could limit tick
328 infestations and interfere with tick-borne pathogen transmission (Merino et al., 2013). For
329 this reason, tick saliva components have attracted attention, posing as prospective antigen
330 vaccine candidates. Salivary MPs have been shown to participate in fibrin and fibrinogen
331 degradation, contributing to saliva anti-blood clotting activity (Francischetti et al., 2003).
332 Also, it was proposed that *I. scapularis* salivary MPs inhibits microvascular endothelial
333 cell proliferation and degrades both α and β subunits of integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 1\beta 1$
334 (Francischetti et al., 2005; Kazimirova and Stibraniova, 2013). Previous studies using *H.*
335 *longicornis* MP as antigen demonstrated that nymph and adult tick mortality increases
336 (Imamura et al., 2009). In *I. ricinus*, inhibition of MPs expression by iRNA prevents
337 completion of tick blood meal and impairs tick saliva fibrinolytic and fibrinogenolytic
338 activities (Decrem et al., 2008a, 2008b). Furthermore, vaccination of hosts with a
339 recombinant MP reduces *I. ricinus* blood meal, weight gain and oviposition rates (Decrem
340 et al., 2008b). Other studies also support the idea that MPs could be useful as an antigen in
341 an anti-tick vaccine (Decrem et al., 2008b; Imamura et al., 2009). Recently we identified
342 putative reprotolysin MPs in three tick species (Ali et al., 2014). Among these, a *R.*
343 *microplus* MP (BrRm-MP4) was selected for further studies because of its transcriptional
344 profile in tick tissues, and *in silico* prediction of immunogenic epitopes suggested that it
345 could be protective against tick infestation. Indeed, immunization of bovines using
346 rBrRm-MP4 reduced tick number, oviposition and egg hatching, providing an overall
347 protection of 60%, and confirming it as an immunoprotective antigen. Until now, only a

348 few antigens have produced this degree of protection against *R. microplus* infestation
349 (Patarroyo et al., 2002; Willadsen, 2004; Hajdusek et al., 2010; Almazan et al., 2010; de la
350 Fuente and Merino, 2013; Merino et al., 2013).

351 BrRm-MP4 is present in several *R. microplus* tissues of partially and fully fed ticks
352 (Fig. 3). Besides, BrRm-MP4, additional proteins of both higher and lower molecular
353 weight was detected in Western blot. This is not surprising, given that sera could
354 recognize common epitopes present in several metalloproteases. Indeed, a similar
355 recognition pattern was found in *I. ricinus* MPs, where anti-MPs antibodies raised in mice
356 immunized with particular MPs also recognize other MPs (Decrem et al., 2008b).
357 Furthermore, several bands in a tissue extract Western blot indicate that in addition to the
358 monomeric form, native BrRm-MP4 may form oligomers (Kato et., 1990; Cominetti et al.,
359 2003). Similar cases have been also observed in other disulfide-rich proteins (PerezVilar et
360 al., 1996; Gong et al., 2007).

361 **Conclusion**

362 In conclusion, rBrRm-MP4 has potential as an antigen in an anti-tick vaccine.
363 rBrRm-MP4 vaccine efficacy may be improved by multi-antigenic formulations as well as
364 chimeric constructs using selected regions from BrRm-MP4, together with other proteins
365 that confer some degree of immunity against ticks.

366 **Acknowledgments**

367 Abid Ali is a receiver of the TWAS/CNPq doctoral fellowship program. Authors
368 gratefully acknowledge the financial support from The World Academy of Sciences
369 (TWAS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

370 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de
371 Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Instituto Nacional
372 de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, (INCT-EM).

373

374 **References**

375 Adamson, S.W., Browning, R.E., Chao, C.C., Bateman, R.C.J., Ching, W., Karim, S.,
376 2013. Molecular characterization of tick salivary gland glutaminyl cyclase. *Insect.*
377 *Biochem. Mol. Biol.* 43, 781-93.

378 Ali, A., Tirloni, L., Isezaki, M., Seixas, A., Konnai, S., Ohashi, K., da Silva Vaz Junior, I.,
379 Termignoni, C., 2014. Reprolysin metallopeptidases from *Ixodes persulcatus*,
380 *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus microplus* ticks. *Exp. Appl. Acarol.*
381 *In press.* DOI 10.1007/s10493-014-9796-9

382 Almazan, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Rosario-Cruz, R., Jongejan, F., de la
383 Fuente, J., 2010. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus)*
384 *microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations.
385 *Parasitol. Res.* 106, 471-479.

386 Barnard, A.C., Nijhof, A.M., Gaspar, A.R.M., Neitz, A.W.H., Jongejan, F., Maritz-
387 Olivier, C., 2012. Expression profiling, gene silencing and transcriptional
388 networking of metzincin metalloproteases in the cattle tick, *Rhipicephalus*
389 *(Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 186, 403-414.

390 Bissinger, B.W., Roe, R.M., 2010. Tick repellents: Past, present, and future. *Pestic.*
391 *Biochem. Physiol.* 96, 63-79.

392 Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
393 quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72,
394 248-254.

395 Canales, M., Enriquez, A., Ramos, E., Cabrera, D., Dandie, H., Soto, A., Falcon, V.,
396 Rodriguez, M., de la Fuente, J., 1997. Large-scale production in *Pichia pastoris* of
397 the recombinant vaccine Gavac^(TM) against cattle tick. *Vaccine* 15, 414-422.

398 Cominetti, M.R., Ribeiro, J.U., Fox, J.W., Selistre-de-Araujo, H.S., 2003. BaG, a new
399 dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom
400 that interacts with alpha5beta1 integrin. *Arch. Biochem. Biophys.* 416, 171-179.

401 Cunha, R.C., Pérez de León, A.A., Leite, F.P.L., Pinto, L.S., Júnior, A.G.S., Andreotti, R.,
402 2012. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with
403 recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 254-262.

404 de la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J.M., Kocan, K.M.,
405 Willadsen, P., 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for
406 control of tick infestations on cattle. *An. Health. Res. Rev.* 2, 3-8.

407 de la Fuente, J., Kocan, K.M., 2006. Strategies for development of vaccines for control of
408 ixodid tick species. *Parasite. Immunol.* 28, 275-83.

409 de la Fuente, J., Merino, 2013. Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine* 31,
410 5923-5929.

411 de la Fuente, J., Rodriguez, M., Montero, C., Redondo, M., Garcia-Garcia, J.C., Mendez,
412 L., Serrano, E., Valdes, M., Enriquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boue, O.,
413 Machado, H., Leonart, R., 1999. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the
414 experience with the Bm86-based vaccine Gavac (TM). *Genet. Anal.: Biomol. Eng.*
415 15, 143-148.

416 de Lima, M.F.R., Ferreira, C.A.S., de Freitas, D.R.J., Valenzuela, J.G., Masuda, A., 2002.
417 Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae)
418 glutathione S-transferase. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 32, 747-754.

419 Decrem, Y., Beaufays, J., Blasioli, V., Lahaye, K., Brossard, M., Vanhamme, L.,
420 Godfroid, E., 2008. A family of putative metalloproteases in the salivary glands of
421 the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS J* 275, 1485-1499.

- 422 Decrem, Y., Mariller, M., Lahaye, K., Blasioli, V., Beaufays, J., Boudjeltia, K.Z.,
423 Vanhaeverbeek, M., Cerutti, M., Brossard, M., Vanhamme, L., Godfroid, E., 2008.
424 The impact of gene knock-down and vaccination against salivary metalloproteases
425 on blood feeding and egg laying by *Ixodes ricinus*. Int. J. Parasitol. 38, 549-560.
- 426 Ferreira, C.A.S., Vaz, I.D., da Silva, S.S., Haag, K.L., Valenzuela, J.G., Masuda, A., 2002.
427 Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae)
428 calreticulin. Exp. Parasitol. 101, 25-34.
- 429 Francischetti, I.M.B., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C., 2003. Cloning of a salivary gland
430 metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities
431 in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. Biochem. Biophys.
432 Res. Commun. 305, 869-875.
- 433 Francischetti, I.M.B., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C., 2005. Tick saliva is a potent inhibitor
434 of endothelial cell proliferation and angiogenesis. Thromb. Haemost. 94, 167-174.
- 435 Garcia-Garcia, J.C., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boue, O.,
436 Rodriguez, M., Joglar, M., Machado, H., Gonzalez, I.L., Valdes, M., Mendez, L.,
437 de la Fuente, J., 2000. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in
438 cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick,
439 *Boophilus microplus*. Vaccine 18, 2275-2287.
- 440 Gomis-Ruth, F.X., 2009. Catalytic Domain Architecture of Metzincin Metalloproteases. J.
441 Biol. Chem. 284, 15353-15357.
- 442 Gong, H.Y., Zhou, J.L., Liao, M., Hatta, T., Harnnoi, T., Umemiya, R., Inoue, N., Xuan,
443 X.N., Fujisaki, K., 2007. Characterization of a carboxypeptidase inhibitor from the
444 tick *Haemaphysalis longicornis*. J. Insect. Physiol. 53, 1079-1087.
- 445 Graf, J.F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G.A., Molento, M.B., Bordin, E.L.,
446 Arantes, G.J., 2004. Tick control: an industry point of view. Parasitol. 129, S427-
447 S442.
- 448 Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R., DE Barros, A.T.M., Silva, R.A., Cançado, P.H.D.,
449 Pérez de león, A.A., Pereira, J.B. Villela, H.S., 2013. Impacto econômico das

450 parasitoses em bovinos no Brasil. Campo Grande. Palestra proferida na
451 Conferência Nacional para Atualização das Perdas Econômicas pelas Parasitoses,
452 EMBRAPA/CNPQC.

453 Guerrero, F.D., Miller, R.J., Pérez de León, A.A., 2012. Cattle tick vaccines: Many
454 candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? Int. J.
455 Parasitol. 42, 421-427.

456 Hajdusek, O., Almazan, C., Loosova, G., Villar, M., Canales, M., Grubhoffer, L.,
457 Kopacek, P., de la Fuente, J., 2010. Characterization of ferritin 2 for the control of
458 tick infestations. Vaccine 28, 2993-2998.

459 Harnnoi, T., Sakaguchi, T., Nishikawa, Y., Xuan, X.A., Fujisaki, K., 2007. Molecular
460 characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from
461 the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem.
462 Mol. Biol. 147, 93-101.

463 Imamura, S., Vaz, I.D., Konnai, S., Yamada, S., Nakajima, C., Onuma, M., Ohashi, K.,
464 2009. Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from
465 *Haemaphysalis longicornis*. Exp. Appl. Acarol. 48, 345-358.

466 Kato, Y., Ogawa, K., Yamamoto, S., Abe, S., Kishi, J., Hayakawa, T., 1990. A novel
467 TIMP-insensitive type IV collagen-degrading metalloproteinase from murine
468 metastatic sarcoma cells. FEBS Lett. 268, 39-42.

469 Kazimirova, M., Stibraniova, I., 2013. Tick salivary compounds: their role in modulation
470 of host defences and pathogen transmission. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3, 43.

471 Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z., 2010. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the
472 Tumor Microenvironment. Cell 141, 52-67.

473 Leal, A.T., Seixas, A., Pohl, P.C., Ferreira, C.A.S., Logullo, C., Oliveira, P.L., Farias,
474 S.E., Termignoni, C., Vaz, I.D., Masuda, A., 2006. Vaccination of bovines with
475 recombinant Boophilus Yolk pro-Cathepsin. Vet. Immunol. Immunopathol. 114,
476 341-345.

477 Merino, M., Antunes, S., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J.A., Pérez de la Lastra, J.M.,
478 Rosario-Cruz, R., Rodríguez, S., Domingos, A., de la Fuente, J., 2013. Vaccination
479 with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and
480 pathogen infection. *Vaccine* 31, 5889-5896.

481 Merino, O., Alberdi, P., de la Lastra, J.M.P., de la Fuente, J., 2013. Tick vaccines and the
482 control of tick-borne pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 30.

483 Muhammad, G., Naureen, A., Firyal, S., Saqib, M., 2008. Tick Control Strategies in Dairy
484 Production Medicine. *Pakistan Vet. J.* 28, 43-50.

485 Parizi, L.F., Utiumi, K.U., Imamura, S., Onuma, M., Ohashi, K., Masuda, A., Vaz, I.D.,
486 2011. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase
487 reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Exp.*
488 *Parasitol.* 127, 113-118.

489 Parizi, L.F., Githaka, N.W., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., Vaz, I.D.,
490 2012a. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights.
491 *Vet. J.* 194, 158-165.

492 Parizi, L.F., Reck, J.Jr., Oldiges, D.P., Guizzo, M.G, Seixas, A, Logullo, C., de Oliveira,
493 P.L., Termignoni, C., Martins, J.R., Vaz, I.D., 2012b. Multi-antigenic vaccine
494 against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation.
495 *Vaccine* 30, 6912-6917.

496 Patarroyo, J.H., Portela, R.W., De Castro, R.O., Pimentel, J.C., Guzman, F., Patarroyo,
497 M.E., Vargas, M.I., Prates, A.A., Mendes, M.A.D., 2002. Immunization of cattle
498 with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86).
499 *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 163-172.

500 PerezVilar, J., Eckhardt, A.E., Hill, R.L., 1996. Porcine submaxillary mucin forms
501 disulfide-bonded dimers between its carboxyl-terminal domains. *J. Biol. Chem.*
502 271, 9845-9850.

- 503 Ramos, O.H.P., Selistre-De-Araujo, H.S., 2006. Snake venom metalloproteases - structure
504 and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp. Biochem. Physiol. C*
505 *Toxicol. Pharmacol.* 142, 328-346.
- 506 Rand, K., Moore, T., Srikatha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., Cobon, G.S.,
507 1989. Cloning and expression of a protective antigen from cattle tick *Boophilus*
508 *microplus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9657-9661.
- 509 Rechav, Y., 1992. Naturally Acquired-Resistance to Ticks - A Global View. *Insect Sci.*
510 *Appl.* 13, 495-504.
- 511 Rivera, S., Khrestchatsky, M., Kaczmarek, L., Rosenberg, G.A., Jaworski, D.M., 2010.
512 Metzincin Proteases and Their Inhibitors: Foes or Friends in Nervous System
513 Physiology? *J. Neurosci.* 30, 15337-15357.
- 514 Rodriguez, M., Massard, C.L., daFonseca, A.H., Ramos, N.F., Machado, H., Labarta, V.,
515 de la Fuente, J., 1995. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen
516 preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and
517 beef pure and cross bred cattle in Brazil. *Vaccine* 13, 1804-1808.
- 518 Rodriguez, M., Penichet, M.L., Mouris, A.E., Labarta, V., Luaces, L.L., Rubiera, R.,
519 Cordoves, C., Sanchez, P.A., Ramos, E., Soto, A., Canales, M., Pelenzuela, D.,
520 Triguero, A., Lleonart, R., Herrera, L., de la Fuente, J., 1995. Control of *Boophilus*
521 *microplus* Populations in Grazing Cattle Vaccinated with A Recombinant Bm86
522 Antigen Preparation. *Vet. Parasitol.* 57, 339-349.
- 523 Rodriguez, M., Rubiera, R., Penichet, M., Montesinos, R., Cremata, J., Falcon, V.,
524 Sanchez, G., Bringas, R., Cordoves, C., Valdes, M., Lleonart, R., Herrera, L., de la
525 Fuente, J., 1994. High-Level Expression of the *B microplus* Bm86 Antigen in the
526 Yeast *Pichia-Pastoris* Forming Highly Immunogenic Particles for Cattle. *J.*
527 *Biotechnol.* 33, 135-146.
- 528 Rodriguez-Mallon, A., Fernandez, E., Encinosa, P.E., Bello, Y., Mendez-Perez, L., Ruiz,
529 L.C., Perez, D., Gonzalez, M., Garay, H., Reyes, O., Mendez, L., Estrada, M.P.,

- 530 2012. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick,
531 *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine* 30, 1782-1789.
- 532 Seixas, A., Leal, A.T., Nascimento-Silva, M.C.L., Masuda, A., Termignoni, C., Vaz, I.D.,
533 2008. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). *Vet.*
534 *Immunol. Immunopathol.* 124, 332-340.
- 535 Sonenshine, D.E., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2006. Tick control: further thoughts on a
536 research agenda. *Trends Parasitol.* 22, 550-551.
- 537 Vaz, I.D., Logullo, C., Sorgine, M., Velloso, F.F., de Lima, M.F.R., Gonzales, J.C.,
538 Masuda, H., Oliveira, P.L., Masuda, A., 1998. Immunization of bovines with an
539 aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet.*
540 *Immunol. Immunopathol*66, 331-341.
- 541 Willadsen, P., 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitology* 129, S367-S387.
- 542 Willadsen, P., 2006. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Vet. Parasitol.* 138,
543 161-168.
- 544 Willadsen, P., Cobon, G., McKenna, R.V., 1996. Comparative vaccination of cattle
545 against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in
546 combination with recombinant Bm91. *Parasite. Immunol.* 18, 241-246.

5. Discussão

MPs possuem um papel importante na hematofagia de vários organismos hematófagos. Vários estudos têm se focado na determinação da sequência de aminoácidos de MPs. No entanto, o papel exato e as funções específicas de MPs na fisiologia dos carrapatos são ainda desconhecidos. Um dos fatores impeditivos para o avanço no estudo dessas funções é a falta de proteínas recombinantes, já que as quantidades de saliva e glândula salivar que se pode obter para usar nos estudos são insuficientes e não permitem estudos exaustivos usando abordagens baseadas no fracionamento de extratos e testes das frações. A produção de MPs do grupo das metzincinas na forma recombinante tem encontrado dificuldades devido ao grande número de resíduos de cisteína (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). Assim, a informação sobre a obtenção dessas enzimas na forma recombinante ainda é escassa. Embora alguns estudos mostrem a expressão de MPs recombinantes, incluindo metzincinas de carrapato (IMAMURA *et al.*, 2009), este problema ainda deve ser contornado para encontrar sistemas alternativos para expressar proteínas desta família fascinante e investigar seus papéis no hematofagia de carrapato. Em relação às sequências de MPs de carrapato presentes em GeneBank, muito ainda permanece a ser explorado. Dados de transcriptomas e genomas de alguns carrapatos não levam diretamente a produtos como vacinas, mas podem fornecer informações úteis para o desenvolvimento de vacinas anti-carrapato.

MPs da saliva de carrapato apresentam atividade sobre várias das proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa dos hospedeiros. Uma delas possui atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica (FRANCISCHETTI *et al.*, 2003). Vários dados reforçam a hipótese de que membros desta família de proteína participam na digestão e liquefação da

ingesta sanguínea de carrapato. A adaptação de MPs ancestrais para a alimentação sanguínea parece ter sido um salto evolutivo simples com mudança de especificidade especialmente para hidrólise de colágeno, fibrinogênio e proteínas relacionadas ao fibrinogênio (MANS *et al.*, 2008).

Identificamos MPs em três espécies de carrapatos importantes do ponto de vista da saúde humana e animal para entender melhor o papel dessas MPs no fisiologia do carrapato. Investigamos a diversidade de MPs nas espécies de carrapatos estudadas. De fato, novas MPs salivares foram encontradas, três em *R. sanguineus* e três em *I. persulcatus*. Além disso, demonstramos polimorfismo em MPs de populações de *R. microplus* geograficamente distintas. Também mostramos a distribuição de MPs em tecidos e estágios de desenvolvimento dos carrapatos *I. persulcatus*, *R. sanguineus* e *R. microplus*.

Comparando MPs de *R. microplus* e *R. sanguineus*, duas MPs são 100 % idênticas (BrRm-MP2 e Rs-MP2; BrRm-MP5 e Rs-MP5). Identidade de 100% entre sequências de espécies de carrapato não é fato raro entre os carrapatos ixodídeos (IBELLI *et al.*, 2013). A identidade entre sequências de aminoácidos de MPs de *I. persulcatus*, *I. ricinus* e *I. scapularis* variou entre 88 % e 97 %. Esta alta identidade entre sequência e motivos típicos funcionais sugere que estas proteínas conservadas podem participar em uma ampla gama de processos biológicos e sua caracterização imunogênica pode revelar novos antígenos-alvo para a uma vacina anti-carrapato.

Observamos diferenças nas seqüências de aminoácidos de BrRm-MPs entre populações de *R. microplus* de diferentes regiões geográficas. Variações em sequências de aminoácidos da mesma proteína em *R. microplus* de diferentes regiões geográficas é uma

questão importante porque isso pode afetar o grau de imunoproteção conferido pela proteína (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000). De fato uma variação superior a 2,8% na sequência de aminoácidos pode ser suficiente para modificar a eficiência imunoprotetora da proteína (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 1999). Uma variação pequena (1,14-4,56%) na sequência de aminoácidos da proteína Bm95 e uma variação entre 3,4 e 6,08% na sequência de aminoácidos da proteína Bm86, comparando carrapatos de diversas regiões do Brasil, Argentina, Uruguai, Venezuela e Colômbia (SOSSAI *et al.*, 2005), são responsáveis pela falta de eficácia das vacinas baseadas na proteína Bm86 em determinadas regiões. As diferenças observadas nas sequências de MPs se assemelham ao que é observado quando se compara cistatinas e Bm86 de carrapatos de diferentes áreas geográficas (SOSSAI *et al.*, 2005; PARIZI *et al.*, 2013).

Apesar dos algoritmos utilizados levarem a certa discrepância nos resultados obtidos para BrRm-MP4 e BrRm-MP5, parece claro que as MPs não possuem região trans-membrana. Esta conclusão é compatível com a observação de que MP de *H. longicornis* encontra-se principalmente no citoplasma das ácinos tipo III da glândula salivar (HARNNOI *et al.*, 2007). Foi demonstrado que ácinos tipo III são o local principal da produção de moléculas salivares bioativas (RIBEIRO & FRANCISCHETTI *et al.*, 2003). Nossos resultados são também compatíveis com os estudos mostrando que N-glicosilação é essencial para o processamento de MPs e proteger a enzima da ação de proteases (ESCREVENTE *et al.*, 2008).

Componentes da glândula salivar de carrapatos têm atraído a atenção como candidatos a antígenos para vacinas anti-carrapato. Esses componentes incluem várias moléculas bioativas sobre os sistemas de defesas dos hospedeiros também moléculas que

ajudam a fixação do aparelho bucal ao hospedeiro (SAUER *et al.*, 1995; SIMO *et al.*, 2011). Os carrapatos possuem sistema de digestão intracelular onde as proteínas do sangue da ingesta são digeridos no interior dos lisossomos pela ação sucessiva de proteases que operam em pH baixo, embora não pode ser descartada a hipótese de que proteases tenham função na tubo digestório, como por exemplo mantendo o sangue no estado líquido (LARA *et al.*, 2005; SOJKA *et al.*, 2008; HORN *et al.*, 2009).

A inibição da proliferação de células do endotélio microvascular e degradação de ambas subunidades (α e β) das integrinas $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 1\beta 1$ pela saliva de *I. scapularis* sugere que MPs sejam responsáveis por essas atividades (FRANCISCHETTI *et al.*, 2005a; KAZIMIROVA & STIBRANIOVA, 2013). Supõe-se que MPs salivares têm papel importante na propagação rápida dos componentes anti-hemostáticos na área da picada, espalhando-os pelas redondezas e resultando na degradação tanto da matriz extracelular como da membrana basal vascular. Uma vez que a infestação por carrapato provoca alterações sistêmicas, além dos efeitos localizados no local da picada, supõe-se que ocorra disseminação de componentes salivares na circulação. Ocorrem mudanças bruscas no conteúdo proteico da saliva e glândula salivar de carrapatos em resposta no início da ingestão de sangue (TIKKI *et al.*, 1999; MULENGA *et al.*, 2007). Foi demonstrado que várias peptidases são reguladas no tempo para executar funções fisiológicas e bioquímicas necessárias para a manutenção da vida e alimentação de carrapato (FRANTA, 2010). Assumindo que a transcrição de um gene em um tecido representa a presença da proteína correspondente; MPs estão entre aquelas que são reguladas desde o início e a fase final de alimentação (ADAMSON *et al.*, 2013). Nossos resultados confirmam que MPs são transcritas na glândula salivar durante todas as etapas de alimentação de sangue, sugerindo que elas participam do mecanismo de alimentação sanguínea.

O perfil transcricional de MPs em tecidos e estágios de desenvolvimento do carrapato sugere que elas têm funções biológicas distintas nas três espécies de carrapatos estudadas. Perfis de transcrição destas MP de glândula salivar são semelhantes aos perfis de transcrição de MPs em outras espécies de carrapato (HARNNOI *et al.*, 2007; DECREM *et al.*, 2008a,b; IMAMURA *et al.*, 2009; BARNARD *et al.*, 2012). A transcrição de MP na glândula salivar é um indício de que essas enzimas participam do repasto sanguíneo de carrapato. Estas proteínas conservadas evolutivamente parecem participar de uma grande variedade de processos biológicos, e sua caracterização pode revelar novos antígenos adequados para comporem vacinas anti-carrapato. No caso de *R. sanguineus*, transcritos de MP foram encontrados também em intestino, possivelmente contribuindo para manter o sangue ingerido permaneça líquido no lúmen do intestino para a digestão, assim como desempenhando um papel antimicrobiano (MAZZI *et al.*, 2004). O perfil transcricional de BrRm-MP1, BrRm-MP4, Rs-MP1, Ip-MP1 e Ip-MP3 sugere que elas têm um papel nos estágios iniciais de desenvolvimento da vida pois são transcritas também em larvas. Uma vez que MPs exclusivamente expressas no sistema reprodutivo masculino dos mamíferos são fundamentais para a espermatogênese ou fertilização (CHO *et al.*, 1998, ZHU *et al.*, 1999) supõe-se que BrRm-MP4 expressa no macho, desempenhe um papel semelhante na espermatogênese do carrapato.

A atividade de várias peptidases é importante para o desenvolvimento dos ovários, oogênese e ovulação. É bem conhecido que os MPs pertencentes ao grupo metzincina convertem formas biologicamente inativas em ativas dos fatores de crescimento epidérmico produzidos por células da granulosa, no homem e em roedores (DONG *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 1999; OHNISHI *et al.*, 2001; HINKLE *et al.*, 2004; BEN-AMI *et al.*, 2006). Algumas enzimas pertencentes ao grupo metzincina têm forte atividade

colagenolítica. Por isso, elas também podem estar envolvidas na ruptura da parede folicular decorrente da estimulação hormonal (CURRY *et al.*, 2003). A transcrição de BrRm-MPs (exceto BrRm-MP3) e Rs-MPs em ovário reforça a hipótese que sugere que MPs de carrapatos participam na reprodução; **(a)** o papel no início do desenvolvimento dos ovários **(b)** ovulação **(c)** oogenesis e outras funções paralelas carrapatos necessitam para a manutenção de sua ovário durante o período de esteiras.

MPs (MMP2) do grupo metzincina são expressas no corpo gorduroso de *D. melanogaster* durante todas as fases a metamorfose (BOND, 2010). É sabido que, além de seu papel de armazenar lipídios para fornecer energia ao longo do desenvolvimento (LOCKE, 1984), o corpo gorduroso sintetiza várias outras moléculas cruciais para o carrapato. Por exemplo, a vitelogenina é sintetizada e processada no corpo gorduroso, liberada para a hemolinfa e incorporada em ovos como a principal proteína do vitelo, a vitelina (ROSELL-DAVIS & COONS, 1989; UMEMIYA-SHIRAFUJI, 2012). A transcrição de MPs no corpo gorduroso de carrapatos sugere que também essas enzimas participam no processamento de proteínas.

Perguntas sempre surgem sobre a natureza dos parálogos desses MPs quanto a serem alelos ou diferentes cópias de genes. Para responder a hipótese que os genes que codificam os membros MPs descritos não são alelos mostramos que **(a)** eles são amplamente divergentes mostrado na árvore filogenética; **(b)** os cDNAs amplificados por estes MPs foram extraídos a partir de uma população de carrapatos isolado que evitar o número de alelos de propagação; **(c)** por último, mas não menos importante, mais do que duas cópias foram observados para ser expressa num mesmo indivíduo (DECREM *et al.*, 2008a).

A demonstração de que a vacinação com um antígeno interno do carrapato, antígeno oculto (molécula que em condições naturais não entra em contato com o sistema imunológico do hospedeiro), induz a produção de anticorpos que quando da ingestão de sangue, atingem seus alvos no carrapato demonstrou que vacinas anti-ectoparasitas são factíveis. A primeira demonstração de que isso era possível foi demonstrada com o *R. microplus* e introduziu o conceito de antígeno oculto (WILLADSEN, 2004 & 2006; SONENSHINE *et al.*, 2006). Este primeiro antígeno que confere imunidade contra carrapato, a proteína Bm86, além de servir como prova da validade do conceito de antígeno oculto também foi a base da primeira vacina disponível comercialmente (Tick-GARD e Gavac) contra qualquer ectoparasito. As duas únicas vacinas anticarrapato lançadas comercialmente são baseadas nesse antígeno. Após algumas mudanças em estratégias comerciais a vacina Tick-GARD deixou de ser comercializada (GUERRERO *et al.*, 2012). Quando carrapatos ingerirem sangue de hospedeiros imunizados com Bm86, ocorre lise de células do intestino através de mecanismo mediado por anticorpos. Como resultado, há redução no número, peso e capacidade reprodutiva dos carrapatos alimentados em animais vacinados. Os ensaios a campo realizados na Austrália e em Cuba (DE LA FUENTE *et al.*, 1999; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000) mostraram um nível de proteção que justificou o lançamento comercial das duas vacinas. Entretanto, em testes realizados no Brasil (RODRIGUEZ *et al.*, 1995; CUNHA *et al.*, 2012), Argentina, Colômbia e México (CANALES *et al.*, 1997) os níveis de proteção conferidos por essas vacinas não foram satisfatórios para o controle de populações de *R. microplus* (DE LA FUENTE *et al.*, 1999). Estudos com vacinas produzidas com Bm95, uma proteína homóloga à Bm86, mostraram proteção contra algumas populações de *R. microplus* refratárias à vacinação com Bm86 (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2000). Devido à

variabilidade entre as populações de carrapatos, antígenos mais adequados devem ser encontrados para se chegar a uma vacina com eficácia suficiente para efetivamente controlar infestações por carrapato.

Estudos anteriores mostraram que MPs poderiam ser úteis como um antígeno em uma vacina para proteção contra *I. ricinus* e *H. longicornis* (DECREM *et al.*, 2008a,b; IMAMURA *et al.*, 2009). O uso de MP de *H. longicornis* como antígeno resultou em mortalidade de ninfas e adultos alimentados nos hospedeiros imunizados (IMAMURA *et al.*, 2009). Estudos com MPs de *I. ricinus* usando a metodologia de iRNA mostraram que a inibição da síntese de MPs impede a refeição sanguínea e afeta a capacidade fibrinolítica da saliva (DECREM *et al.*, 2008a). Também, a vacinação de hospedeiros com uma MP recombinante produzida em sistema de expressão eucariótico interfere com a conclusão da refeição sanguínea, o ganho de peso e a taxa de oviposição de *I. ricinus* (DECREM *et al.*, 2008b). Esses achados reforçam a ideia de que MPs sejam bons alvos para o desenvolvimento de vacinas anticarrapato. Dentre estas seqüências, uma MP de *R. microplus* (BrRm-MP4) foi selecionada para estudos posteriores, porque se encontra em vários tecidos da fêmea e no macho e ainda apresentar uma sequência de aminoácidos teoricamente altamente antigênica. Depois de expressão heteróloga, a rBrRm-MP4 purificada foi utilizada em testes de vacinação em bovinos e desafio por *R. microplus*. A vacinação com rBrRm-MP4 reduziu a infestação por *R. microplus*, evidenciando que o potencial que esse antígeno possui para utilização em uma vacina anti-carrapato.

Utilizando soros anti-rBrRm-MP4 foi confirmada a presença de BrRm-MP4 e variantes com diferente massa molecular em vários tecidos de fêmea de *R. microplus*, parcialmente e totalmente alimentadas. Não está claro, entretanto, se essas variações de

peso molecular observadas para BrRm-MP4 são devidas a diferentes isoformas ou diversidade no processamento proteolítico. Resultados semelhantes foram encontrados em *I. ricinus*, onde anticorpos anti-MPs (Metis) produzidos em camundongos imunizados com Metis3 e Metis4 (DECREM *et al.*, 2008a,b) reconheceram Metis3 e Metis4, enquanto que o soro anti-Metis1 reagiu com Metis1 e Metis2. Foi sugerido que algumas Metis exibem epitopos semelhantes, o que é compatível com a nossa hipótese de que os soros anti-rBrRm-MP4 reconhecem epítomos semelhantes também nas outras MPs dos tecidos. As massas moleculares encontradas para as MPs nativas correspondem ao tamanho calculado a partir das sequências de aminoácidos deduzidas das sequências nucleotídicas correspondentes. Além disso, o fato de que anticorpos anti-rBrRm-MP4 reconhecerem várias proteínas nos extratos de tecidos também sugere que, em adição à forma monomérica, BrRm-MP4 pode formar oligômeros. Casos semelhantes foram observados em outras proteínas ricas em dissulfeto (PEREZ-VILAR *et al.*, 1996; GONG *et al.*, 2007). O fato de que anticorpos anti BrRm-MP4 reconhecerem a proteína nativa em extratos de glândula salivar e em larva reforça nossa hipótese sobre o papel dessa enzima tanto na alimentação sanguínea como nas fases iniciais do desenvolvimento do carrapato.

A imunização de *Bos taurus taurus* usando rBrRm-MP4 como antígeno contra infestação por *R. microplus* diminuiu significativamente o número de carrapatos que completaram o ciclo de vida parasitário e a eclosão em 43% e 15%, respectivamente e a capacidade de postura foi afetada em 17%, perfazendo uma proteção total de 60%. Os resultados deste estudo mostram que rBrRm-MP4 tem potencial para ser um dos componentes antigênicos de uma vacina para o controle de *R. microplus*. Comparando com outros antígenos testados para proteger contra carrapatos este grau de proteção é um dos maiores encontrados até agora (RODRIGUEZ *et al.*, 1995; SAUER *et al.*, 1995;

PATARROYO *et al.*, 2002; WEISS *et al.*, 2004; HAJDUSEK *et al.*, 2010; ALMAZÁN *et al.*, 2010).

6. Conclusão e perspectivas

Em conclusão, este estudo identifica a presença de várias MPs em tecidos e fases de desenvolvimento do carrapato e a capacidade imunoprotetora contra infestações por *R. microplus*, abrindo a perspectiva do uso desta proteína como imunógeno em uma vacina contra carrapato. Melhoria na eficácia da vacina rRmBr-MP4 poderia ser alcançado por formulações multi-antigênicas, bem como construções quiméricas que utilizam regiões selecionadas BrRm- MP4 que conferem proteção contra a infestação de carrapatos. Estas proteínas evolutivamente conservadas participam de uma ampla variedade de processos biológicos e sua investigação pode abrir a porta para o desenvolvimento de nova vacina candidata anti-parasita.

7. Referências

- ADAMSON, S. W., BROWNING, R. E., CHAO, C. C., BATEMAN, R. C., Jr., CHING, W. M. & KARIM, S. Molecular characterization of tick salivary gland glutaminyl cyclase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43: 781-93, 2013.
- 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.
- ANATRIELLO, E., RIBEIRO, J. M., DE MIRANDA-SANTOS, I. K., BRANDÃO, L. G., ANDERSON, J. M., VALENZUELA, J. G., MARUYAMA, S. R., SILVA, J. S. & FERREIRA, B. R. An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *BMC Genomics*, 22(11): 450, 2010.
- ANDERSON, J. M., SONENSHINE, D. E. & VALENZUELA, J. G. Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics*, 9: 552, 2008.
- APTE, S. S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36: 981-5. 2004.
- AROLAS, J. L., LORENZO, J., ROVIRA, A., CASTELLA, J., AVILES, F. X. & SOMMERHOFF, C. P. A carboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 3441-8, 2005.
- AROLAS, J. L., BRONSOMS, S., VENTURA, S., AVILES, F. X. & CALVETE J. J. Characterizing the tick carboxypeptidase inhibitor: molecular basis for its two-domain nature. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(32):22906-16, 2006.
- ASSUMPCAO, T. C., RIBEIRO, J. M. & FRANCISCHETTI, I. M. Disintegrins from hematophagous sources. *Toxins (Basel)*, 4: 296-322, 2012.
- BAKER, A. H., EDWARDS, D. R. & MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*, 115: 3719-27. 2002.

- BALKWILL, F. & MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357, 539-45, 2001.
- BARNARD, A. C., NIJHOF, A. M., GASPAR, A. R., NEITZ, A. W., JONGEJAN, F. & MARITZ-OLIVIER, C. Expression profiling, gene silencing and transcriptional networking of metzincin metalloproteases in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 186: 403-14, 2012.
- BASTIANI, M., HILLEBRAND, S., HORN, F., KIST, T. B., GUIMARAES, J. A. & TERMIGNONI, C. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1439-46, 2002.
- BECHARA, G. H., SZABO, M. P. J., FERREIRA, B. R. & GARCIA, M. V. *Rhipicephalus sanguineus* in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 4: 61-66, 1995.
- BEN-AMI, I., FREIMANN, S., ARMON, L., DANTES, A., RON-EL, R. & AMSTERDAM, A. Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. *Molecular Human Reproduction*, 12: 413-9, 2006.
- BEYNON, R. J. & BOND, J. S. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. p. 114: 1990.
- BJARNASON, J. B. & FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology & Therapeutics* 62(3): 325-72, 1994.
- BJORKLUND, M. & KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1755: 37-69, 2005.
- BLOBEL, C. P. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6: 32-43, 2005.
- BODE, W., GOMIS-RUTH, F. X., HUBER, R., ZWILLING, R. & STOCKER, W. Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature*, 358: 164-7, 1992.

- BOLDT, H.B., OVERGAARD, M. T., LAURSEN, L. S., WEYER, K., SOTTRUP-JENSEN, L. & OXVIG, C. Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): classification as a metzincin. *Biochemical Journal*, 358: 359-367, 2001.
- BOND, N. D. The Role of ecdysone signaling in fat-body tissue remodeling and pupal metabolism. Dissertation, University of Nevada Las Vegas, 2010.
- BOWMAN, A. S. & SAUER, J. R. Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology*, 129: 67-81, 2004.
- BRUMPT, E. Longévité du virus de la fièvre boutonuse (*Rickettsia conorii* n. sp.) chez la tique *Rhipicephalus sanguineus*. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 110:1199-1209, 1932.
- CANALES, M., ALMAZÁN, 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: 29, 2009.
- CANALES, M., ENRIQUEZ, A., RAMOS, E., CABRERA, D., DANDIE, H., SOTO, A., FALCÓN, V., RODRÍGUEZ, M. & DE LA FUENTE, J. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac(TM) against cattle tick. *Vaccine*, 15(4): 414-22, 1997.
- CHMELAR, J., ANDERSON, J. M., MU, J., JOCHIM, R. C., VALENZUELA, J. G. & KOPECKÝ, J. Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. *BMC Genomics*, 9: 233, 2008.
- CHMELAR, J., CALVO, E., PEDRA, J. H., FRANCISCHETTI, I. M. & KOTSYFAKIS, M. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics*, 75(13): 3842-54, 2012.
- CHO, C., BUNCH, D. O., FAURE, J. E., GOULDING, E. H., EDDY, E. M., PRIMAKOFF, P. & MYLES, D. G. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science*, 281: 1857-9, 1998.

- CORDOVÉS, C. O. Carrapato: controle ou erradicação. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, p. 177, 1997.
- CUNHA, R. C., PÉREZ DE LEÓN, A. A., LEITE, F. P. L., PINTO, L. S., JÚNIOR, A. G. S. & ANDREOTTI, R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(3): 254-262, 2012.
- CURRY, T. E., Jr. & OSTEEN, K. G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine Reviews*, 24: 428-65, 2003.
- DAGDA, R. K., GASANOV, S., OIII, Y. D. L., RAEL, E. D. & LIEB, C. S. Genetic basis for variation of metalloproteinase-associated biochemical activity in venom of the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Biochemistry Research International*, Article ID, 251474, 2013.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152: 173-85, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Ticks on domestic animals in Pernambuco, North eastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18: 22-8, 2009.
- DANTAS-TORRES, F., CHOMEL, B. B. & OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends in Parasitology*, 28: 437-46, 2012.
- DE LA FUENTE, J., ALMAZAN, C., CANALES, M., PEREZ DE LA LASTRA, J. M., KOCAN, K. M. & WILLADSEN, P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews*, 8: 23-8, 2007.
- 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. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 15: 143-8, 1999.

- DECREM, Y., BEAUFAYS, J., BLASIOLI, V., LAHAYE, K., BROSSARD, M., VANHAMME, L. & GODFROID, E. A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS Journal*, 275: 1485-99, 2008a.
- DECREM, Y., MARILLER, M., LAHAYE, K., BLASIOLI, V., BEAUFAYS, J., ZOUAOU BOUDJELTIA, K., VANHAEVERBEEK, M., CERUTTI, M., BROSSARD, M., VANHAMME, L. & GODFROID, E. The impact of gene knock-down and vaccination against salivary metalloproteases on blood feeding and egg laying by *Ixodes ricinus*. *International Journal for Parasitology*, 38: 549-60, 2008b.
- DERYUGINA, E. I. & QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 25(1): 9-34, 2006.
- DONG, J. Y., OPRESKO, L. K., DEMPSEY, P. J., LAUFFENBURGER, D. A., COFFEY, R. J. & WILEY, H. S. Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 6235-40, 1999.
- ESCREVENTE, C., MORAIS, V. A., KELLER, S., SOARES, C. M., ALTEVOGT, P. & COSTA, J. Functional role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780: 905-13, 2008.
- FAMBROUGH, D., PAN, D., RUBIN, G.M. & GOODMAN, C. S. The cell surface metalloprotease/ disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23):13233-8, 1996.
- FLETCHER, P. L., Jr., FLETCHER, M. D., WENINGER, K., ANDERSON, T. E. & MARTIN, B. M. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 7405-16, 2010.
- FOX, J. W. & SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS Journal*, 275(12):3016-30, 2008.

- FRANCISCHETTI, I. M. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon*, 56: 1130-44, 2010.
- FRANCISCHETTI, I. M., ANDERSON, J. M., MANOUKIS, N., PHAM, V. M. & RIBEIRO J.M. An insight into the sialotranscriptome and proteome of the coarse bontlegged tick, *Hyalomma marginatum rufipes*. *Journal of Proteomics*, 74(12):2892-08, 2011.
- FRANCISCHETTI, I. M., MANS, B. J., MENG, Z., GUDDERRA, N., VEENSTRA, T. D., PHAM, V. M. & RIBEIRO, J. M. An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1):1-21, 2008a.
- FRANCISCHETTI, I. M., MATHER, T. N. & RIBEIRO, J. M. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305: 869-75, 2003.
- FRANCISCHETTI, I. M., MATHER, T. N. & RIBEIRO, J. M. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 94(1):167-74, 2005a.
- FRANCISCHETTI, I. M., MY PHAM, V., MANS, B. J., ANDERSEN, J. F., MATHER, T. N., LANE, R. S. & RIBEIRO, J. M. The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 1142-61, 2005b.
- FRANCISCHETTI, I.M., MENG, Z., MANS, B.J., GUDDERRA, N., HALL, M., VEENSTRA, T. D., PHAM, V. M., KOTSYFAKIS, M. & RIBEIRO, J. M. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. *Journal of Proteomics*, 71(5): 493-12, 2008b.
- 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: 119. 2010.

- GALAZKA, G., WINDSOR, L. J., BIRKEDAL-HANSEN, H. & ENGLER, J. A.
Spontaneous propeptide processing of mini-stromelysin-1 mutants blocked by APMA ((4-Aminophenyl) mercuric acetate). *Biochemistry*, 38: 1316-22, 1999.
- GARCÍA-GARCÍA, J. C., GONZALEZ, I. L., GONZALEZ, D. M., VALDES, M., MENDEZ, L., LAMBERTI, J., D'AGOSTINO, B., CITRONI, D., FRAGOSO, H., ORTIZ, M., RODRIGUEZ, M. & DE LA FUENTE, J. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Experimental and Applied Acarology*, 23:883-895, 1999.
- 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: 2275-87, 2000.
- GHOSH, S., BANSAL, G. C., GUPTA, S. C., RAY, D., KHAN, M. Q., IRSHAD, H., SHAHIDUZZAMAN, M., SEITZER, U. & AHMED, J. S. Status of tick distribution in Bangladesh, India and Pakistan. *Parasitology Research*, 101 (2): 207-16, 2007.
- GIALELI, C., THEOCHARIS, A. D. & KARAMANOS, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal*, 278(1):16-27, 2011.
- GODDARD, J. Ticks of Medical Importance Occurring in the Western Hemisphere. USAF School of Aerospace Medicine, Texas. 1987.
- GOMIS-RÜTH, F. X. Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. *Molecular Biotechnology*, 24 (2): 157-202, 2003.
- GOMIS-RÜTH, F. X. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 15353-15357, 2009.

- GONG, H., ZHOU, J., LIAO, M., HATTA, T., HARNNOI, T., UMEMIYA, R., INOUE, N., XUAN, X. & FUJISAKI, K. Characterization of a carboxypeptidase inhibitor from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Insect Physiology*, 53: 1079-87, 2007.
- GONZALES, J. C. O controle do carrapato do boi. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, p. 235, 1995.
- 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: 427-42, 2004.
- GRISI, L., LEITE, R. C., MARTINS, J. R., DeBARROS, A. T. M., SILVA, R. A., CANÇADO, P. H. D., PÉREZ DE LEÓN, A. A., PEREIRA, J. B. & VILLELA, H. S. Impacto econômico das parasitoses em bovinos no Brasil. Campo Grande,. Palestra proferida na Conferência Nacional para Atualização das Perdas Econômicas pelas Parasitoses, EMBRAPA/CNPQC. 2013.
- GUERRERO, F. D., MILLER, R. J. & PEREZ DE LEON, A. A. Cattle tick vaccines: many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *International Journal for Parasitology*, 42: 421-7, 2012.
- GUGLIELMONE, A. A., ROBBINS, R. G., APANASKEVICH, D. A., PETNEY, T. N., ESTRADA-PENA, A., HORAK, I. G., SHAO, R. & BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* 2528: 1-28, 2010.
- HAJDUSEK, O., ALMAZAN, C., LOOSOVA, G., VILLAR, M., CANALES, M., GRUBHOFFER, L., KOPACEK, P. & DE LA FUENTE, J. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine*, 28: 2993-8, 2010.
- HAJDUSEK, O., SIMA, R., AYLLON, N., JALOVECKA, M., PERNER, J., DE LA FUENTE, J. & KOPACEK, P. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3: 26, 2013.
- HARNNOI, T., SAKAGUCHI, T., NISHIKAWA, Y., XUAN, X. & FUJISAKI, K. Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Comparative*

- Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 147: 93-101, 2007.
- HATI, R., MITRA, P., SARKER, S. & BHATTACHARYYA, K. K. Snake venom hemorrhagins. *Critical Reviews in Toxicology*, 29: 1-19, 1999.
- HAYASAKA, D., IVANOV, L., LEONOVA, G. N., GOTO, A., YOSHII, K., MIZUTANI, T., KARIWA, H. & TAKASHIMA, I. Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. *Journal of General Virology*, 82: 1319-28, 2001.
- HELOISA, S., SELISTRE-DE-ARAUJO, PONTES, C. L. S., MONTENEGRO, C. F. & MARTIN, A. C. B. M. Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. *Toxins (Basel)*, 2(11): 2606-21, 2010.
- HINKLE, C. L., SUNNARBORG, S. W., LOISELLE, D., PARKER, C. E., STEVENSON, M., RUSSELL, W. E. & LEE, D. C. Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 24179-88, 2004.
- HITE, L. A., SHANNON, J. D., BJARNASON, J. B. & FOX, J. W. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. *Biochemistry* 31(27): 6203-11, 1992.
- HORAK, I. G., CAMICAS, J. L. & KEIRANS, J. E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental and Applied Acarology*, 28: 27-54, 2002.
- 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 multipetidase pathway by functional proteomics. *Chemistry & Biology*, 16: 1053-63, 2009.

- HUOVILA, A. P., TURNER, A. J., PELTO-HUIKKO, M., KARKKAINEN, I. & ORTIZ, R. M. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30: 413-22, 2005.
- IBELLI, A. M., HERMANCE, M. M., KIM, T. K., GONZALEZ, C. L. & MULENGA, A. Bioinformatics and expression analyses of the *Ixodes scapularis* tick cystatin family. *Experimental and Applied Acarology*, 60: 41-53, 2013.
- IMAMURA, S., DA SILVA VAZ, I., Jr., KONNAI, S., YAMADA, S., NAKAJIMA, C., ONUMA, M. & OHASHI, K. Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from *Haemaphysalis longicornis*. *Experimental and Applied Acarology*, 48: 345-58, 2009.
- IOFFE -USPENSKY, I., MUMCUOGLU, K.Y., USPENSKY, I. & GALUN, R. *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus* (Acari: Ixodi-dae): closely related species with different biological characteristics. *Journal of Medical Entomology*, 34: 74-81, 1997.
- JOH, J. H., KIM, B. G., KONG, W. S., YOO, Y. B., KIM, N. K., PARK, H. R., CHO, B. G. & LEE, C. S. Cloning and developmental expression of a metzincin family metalloprotease cDNA from oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 239: 57-62, 2004.
- JIA, L. G., SHIMOKAWA, K., BJARNASON, J. B. & FOX, J. W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon*, 34(11-12):1269-76, 1996.
- KANG, Y. B. & JANG, D. H. A description with scanning electron microscopy on the tick *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) male and female specimens. *Kisaengchunghak Chapchi*, 23: 305-312, 1985.
- KARIM, S., SINGH, P. & RIBEIRO, J. M. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. *PLoS One*, 6(12): 28525, 2011.
- KAZIMIROVA, M. & STIBRANIOVA, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3: 43, 2013.

- KINI, R. M. & EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon*, 30(3):265-93, 1992.
- KOCH, H. G. Oviposition of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) in the laboratory. *Annals of the Entomological Society of America*, 75, 583-86, 1982.
- KOLONIN G.V., Fauna of ixodid ticks of the world (Acari: Ixodidae). Moskow. on-line. http://www.kolonin.org/17_2.html#r27, Moscow, 2009.
- KONNAI, S., NISHIKADO, H., YAMADA, S., IMAMURA, S., ITO, T., ONUMA, M., MURATA, S. & OHASHI, K. Molecular identification and expression analysis of lipocalins from blood feeding taiga tick, *Ixodes persulcatus* Schulze. *Experimental Parasitology*, 127: 467-74, 2011.
- KONNAI, S., SAITO, Y., NISHIKADO, H., YAMADA, S., IMAMURA, S., MORI, A., ITO, T., ONUMA, M. & OHASHI, K. Establishment of a laboratory colony of taiga tick *Ixodes persulcatus* for tick-borne pathogen transmission studies. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 55: 85-92, 2008.
- KOSHY, T. J., RAJAVELU, G. & LALITHA, C. M. On the life cycle of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Cheiron* 12: 337-338, 1983.
- KOVALEV, S. Y. & MUKHACHEVA, T. A. Phylogeographical structure of the tick *Ixodes persulcatus*: a novel view. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3: 212-8. 2012.
- LARA, F. A., LINS, U., BECHARA, G. H. & OLIVEIRA, P. L. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *The Journal of Experimental Biology*, 208: 3093-101, 2005.
- LEAL, A. T., SEIXAS, A., POHL, P. C., FERREIRA, C. A., LOGULLO, C., OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E., TERMIGNONI, C., DA SILVA VAZ, I., Jr. & MASUDA, A. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114: 341-5, 2006.
- LEGG, A. T. & OCONNOR, T. P. Gradients and growth cone guidance of grasshopper neurons. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 51(4): 445-54, 2003.

- LEGER, E., VOUREC'H, G., VIAL, L., CHEVILLON, C. & McCOY K. D. Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Experimental and Applied Acarology*, 59: 219–244. 2013.
- LITTLEPAGE, L. E., EGEBLAD, M. & WERB, Z. Coevolution of cancer and stromal cellular responses. *Cancer Cell*, 7: 499-500, 2005.
- LIU, K., OLOFSSON, J. I., WAHLBERG, P. & NY, T. Distinct expression of gelatinase A [matrix metalloproteinase (MMP)-2], collagenase-3 (MMP-13), membrane type MMP 1 (MMP-14), and tissue inhibitor of MMPs type 1 mediated by physiological signals during formation and regression of the rat corpus luteum. *Endocrinology*, 140: 5330-8, 1999.
- LOCKE, M. The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: King RC, Akai H (Ed.) *Insect Ultrastructure*, Volume 2, 1st edn. Plenum Press, New York, p. 151-197, 1984.
- LOECHEL, F., FOX, J. W., MURPHY, G., ALBRECHTSEN, R. & WEWER U.M. ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278: 511-515, 2000.
- LOULY, C. C. B., FONSECA, I. N., OLIVEIRA, V. F., LINHARES, G. F. C., MENEZES, L. B. & BORGES, L. M. F. Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiania, Goias, Brazil. *Ciência Rural*. 37: 464-469, 2007.
- MACOURS, N. & HENS, K. Zinc-metalloproteases in insects: ACE and ECE. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 501-10, 2004.
- MADDER, M., THYS, E., GEYSEN, D., BAUDOUX, C. & HORAK, I. *Boophilus microplus* ticks found in West Africa. *Experimental and Applied Acarology*, 43: 233–234. 2007.
- MAHLAKU, M. Biochemical investigations into the proteolytic activities in salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi*. Dissertation, University of Pretoria. 2007.

- MALTA, M. B., LIRA, M. S., SOARES, S. L., ROCHA, G. C., KNYSAK, I., MARTINS, R., GUIZZE, S. P., SANTORO, M. L. & BARBARO, K. C. Toxic activities of Brazilian centipede venoms. *Toxicon*, 52: 255-63, 2008.
- MANS, B. J., ANDERSEN, J. F., FRANCISCHETTI, I. M., VALENZUELA, J. G., SCHWAN, T. G., PHAM, V. M., GARFIELD, M. K., HAMMER, C. H. & RIBEIRO, J. M. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38(1): 42-58, 2008.
- MANSFELD, J. Chapter 14, in *Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications*, Polaina, Julio; MacCabe, Andrew P. (Eds.) 2007, p. 642 . 2007.
- MARUYAMA, S. R., ANATRIELLO, E., ANDERSON, J. M., RIBEIRO, J. M., BRANDÃO, L. G., VALENZUELA, J. G., FERREIRA, B. R., GARCIA, G. R., SZABÓ, M. P., PATEL, S., BISHOP, R. & DE MIRANDA-SANTOS, I. K. The expression of genes coding for distinct types of glycine-rich proteins varies according to the biology of three metastriate ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense*. *BMC Genomics*, 11: 363, 2010.
- MAZZI, M. V., MARCUSSI, S., CARLOS, G. B., STABELI, R. G., FRANCO, J. J., TICLI, F. K., CINTRA, A. C., FRANCA, S. C., SOARES, A. M. & SAMPAIO, S. V. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon*, 44: 215-23, 2004.
- 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*, 3:30, 2013.
- MERLOS-SUAREZ, A., RUIZ-PAZ, S., BASELGA, J. & ARRIBAS, J. Metalloprotease-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 48510-7, 2001.
- MEYER, H., PANZ, M., ALBRECHT, S., DRECHSLER, M., WANG, S., HÜSKEN, M., LEHMACHER, C. & PAULULAT, A. Drosophila metalloproteases in

- development and differentiation: the role of ADAM proteins and their relatives. *European Journal of Cell Biology*, 90(9): 770-80, 2011.
- MILLA, M. E., LEESNITZER, M. A., MOSS, M. L., CLAY, W. C., CARTER, H. L., MILLER, A. B., SU, J. L., LAMBERT, M. H., WILLARD, D. H., SHEELEY, D. M., KOST, T. A., BURKHART, W., MOYER, M., BLACKBURN, R. K., PAHEL, G. L., MITCHELL, J. L., HOFFMAN, C. R. & BECHERER, J. D. Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 30563-70, 1999.
- MORAES-FILHO, J., PINTER, A., PACHECO, R. C., GUTMANN, T. B., BARBOSA, S. O., GONZALES, M. A., MURARO, M. A., CECILIO, S. R. & LABRUNA, M. B. New epidemiological data on Brazilian spotted fever in an endemic area of the state of Sao Paulo, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9: 73-8, 2009.
- MOURA-DA-SILVA, A. M., FURLAN, M. S., CAPORRINO, M. C., GREGO, K. F., PORTES-JUNIOR, J. A., CLISSA, P. B., VALENTE, R. H. & MAGALHÃES, G. S. Diversity of metalloproteinases in Bothrops neuwiedi snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPS. *BMC Genetics*, 12: 94, 2011.
- MUHAMMAD, G., NAUREEN, A., FIRYAL, S. & SAQIB, M. Tick Control Strategies in Dairy Production Medicine. *Pakistan Veterinary Journal*, 28(1):43-50.2008.
- MULENGA, A. & ERIKSON, K. A snapshot of the *Ixodes scapularis* degradome. *Gene*, 482(1-2): 78-93, 2011.
- MULENGA, A., BLANDON, M. & KHUMTHONG, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. *Experimental and Applied Acarology*, 41: 267-87, 2007.
- NAGARAJU, S., GIRISH, K. S., FOX, J.W. & KEMPARAJU, K. 'Partitagin' a hemorrhagic metalloprotease from *Hippasa partita* spider venom: role in tissue necrosis. *Biochimie*, 89(11), 1322-31, 2007.

- NAGLICH, J. G., JURE-KUNKEL, M., GUPTA, E., FARGNOLI, J., HENDERSON, A. J., LEWIN, A. C., TALBOTT, R., BAXTER, A., BIRD, J., SAVOPOULOS, R., WILLS, R., KRAMER, R. A. & TRAIL, P. A. Inhibition of angiogenesis and metastasis in two murine models by the matrix metalloproteinase inhibitor, BMS-275291. *Cancer Research*, 61: 8480-5, 2001.
- NAKAMURA, M., MIYAMOTO, S., MAEDA, H., ISHII, G., HASEBE, T., CHIBA, T., ASAKA, M. & OCHIAI, A. Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(3):1011-6, 2005.
- NALDINI, A., & CARRARO, F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 4(1): 3-8, 2005.
- NUTTALL, G. H. F. Observations on the biology of Ixodidae. *Parasitology*, 7: 408-456, 1915.
- OHNISHI, J., OHNISHI, E., JIN, M., HIRANO, W., NAKANE, D., MATSUI, H., KIMURA, A., SAWA, H., NAKAYAMA, K., SHIBUYA, H., NAGASHIMA, K. & TAKAHASHI, T. Cloning and characterization of a rat ortholog of MMP-23 (matrix metalloproteinase-23), a unique type of membrane-anchored matrix metalloproteinase and conditioned switching of its expression during the ovarian follicular development. *Molecular Endocrinology*, 15: 747-64, 2001.
- OVERALL, C. M. & LOPEZ-OTIN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nature Reviews Cancer*, 2: 657-72, 2002.
- PACHECO, R. C., MORAES-FILHO, J., GUEDES, E., SILVEIRA, I., RICHTZENHAIN, L. J., LEITE, R. C. & LABRUNA, M. B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Medical and Veterinary Entomology*, 25: 148-55, 2011.
- PACKILA, M. & GUILFOILE, P. G. Mating, male *Ixodes scapularis* express several genes including those with sequence similarity to immunoglobulin-binding

- proteins and metalloproteases. *Experimental and Applied Acarology*, 27(1-2):151-60, 2002.
- PAGE-McCAW, A., SERANO, J., SANTÉ, J. M. & RUBIN, G. M. Drosophila matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Developmental Cell*, 4(1): 95-106, 2003.
- PALUS, M., ZAMPACHOVA, E., ELSTEROVA, J. & RUZEK, D. Serum matrix metallo-proteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in patients with tick-borne encephalitis. *Journal of Infection*. 2013,
- PARIZI, L. F., GITHAKA, N. W., ACEVEDO, C., BENAVIDES, U., SEIXAS, A., LOGULLO, C., KONNAI, S., OHASHI, K., MASUDA, A. & DA SILVA VAZ, I., Jr. Sequence characterization and immunogenicity of cystatins from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4: 492-9, 2013.
- PARIZI, L. F., GITHAKA, N. W., LOGULLO, C., KONNAI, S., MASUDA, A., OHASHI, K. & DA SILVA VAZ, I., jr. The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. *The Veterinary Journal* , 194: 158-65, 2012.
- PARIZI, L. F., POHL, P. C., MASUDA, A. & VAZ, I. D. S. J. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18: 1-7, 2009.
- PARIZI, L. F., RECK, J., Jr., OLDIGES, D. P., GUIZZO, M. G., SEIXAS, A., LOGULLO, C., DE OLIVEIRA, P. L., TERMIGNONI, C., MARTINS, J. R. & VAZ, I. D. S. Jr. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. *Vaccine*, 30: 6912-7, 2013.
- PARIZI, L. F., UTIUMI, K. U., IMAMURA, S., ONUMA, M., OHASHI, K., MASUDA, A. & DA SILVA VAZ, I. Jr. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Experimental Parasitology*, 127(1): 113-8, 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.
- PEGRAM, R. G., CLIFFORD, C. M., WALKER, J. B. & KEIRANS, J. E. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). *I. R. sulcatus* Neumann, 1908 and *R. turanicus* Pomerantsev, 1936. *Systematic Parasitology*, 10: 3-26, 1987.
- PEREZ-VILAR, J., ECKHARDT, A. E. & HILL, R. L. Porcine submaxillary mucin forms disulfide-bonded dimers between its carboxyl-terminal domains. *Journal of Biological Chemistry*, 271(16): 9845-50, 1996.
- PETROVA-PIONTKOVSKAYA, S. P. Comparative data on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* Latr. and *Rhipicephalus turanicus* Pom. under laboratory conditions. *Zoologicheskyy zhurnal*, 25: 173-176, 1947.
- RAMOS, O. H. P. & SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Snake venom metalloproteases-structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology*, 142, 328-346, 2006.
- RECHAV, Y. Naturally Acquired-Resistance to Ticks -A Global View. *Insect Science and its Application*, 13: 495-504, 1992.
- REDONDO, M., FRAGOSO, H., ORTÍZ, M., MONTERO, C., LONA, J., MEDELLÍN, J. A., FRÍA, R., HERNÁNDEZ, V., FRANCO, R., MACHADO, H., RODRÍGUEZ, M. & DE LA FUENTE, J. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac and amidine treatments. *Experimental and Applied Acarology*, 23(10): 841-9, 1999.
- RIBEIRO, J. M. & FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology*, 48: 73-88, 2003.

- RIBEIRO, J. M., ANDERSON, J. M., MANOUKIS., N. C., MENG, Z. & FRANCISCHETTI, I. M. A further insight into the sialome of the tropical bont tick. *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics*, 12: 136, 2011.
- RIBEIRO, J. M., LABRUNA, M. B., MANS, B. J., MARUYAMA, S. R., FRANCISCHETTI, I. M., BARIZON, G. C. & DE MIRANDA-SANTOS, I. K. The sialotranscriptome of *Antricola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(5): 332-42, 2012.
- RIBEIRO, J. M., & MATHER, T. N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Experimental Parasitology*, 89(2): 213-21, 1998.
- ROCHA, C. M. B. M. Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Lavras: UFLA. Boletim técnico: série Extensão da Universidade Federal de Lavras, ano VII, 1998.
- RODRÍGUEZ, M., PENICHER, M. L., MOURIS, A. E., LABARTA, V., LUACES, L. L., RUBIERA, R., CORDOVÉS, C., SÁNCHEZ, P. A., RAMOS, E., SOTO, A. CANALES, M. PALENZUELA, D. TRIGUERO, A. LLEONART, R. HERRERA, L. & DE LA FUENTE, J. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Veterinary Parasitology*, 57(4): 339-49, 1995.
- RODRIGUEZ, M., MASSARD, C. L., DA FONSECA, A. H., RAMOS, N.F., MACHADO, H., LABARTA, V. & DE LA FUENTE 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(18): 1804-8, 1995.
- RODRÍGUEZ-MALLON, A., FERNÁNDEZ, E., ENCINOSA, P. E., BELLO, Y., MÉNDEZ -PÉREZ, L., RUIZ, L.C., PÉREZ, D., GONZÁLEZ, M., GARAY, H., REYES, O., MÉNDEZ, L. & ESTRADA, M. P. A novel tick antigen shows high

- vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine*, 30(10): 1782-90, 2012.
- ROSELL-DAVIS, R. & COONS, L. B. Relationship between feeding, mating, vitellogenin production and vitellogenesis in the tick *Dermacentor variabilis*. *Experimental and Applied Acarology*, 7(1): 95-105, 1989.
- RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(2): 267-85, 2005.
- SAUER, J. R., ESSENBERG, R. C. & BOWMAN, A. S. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *Journal of Insect Physiology*, 46: 1069-1078, 2000.
- SAUER, J. R., MCSWAIN, J. L., BOWMAN, A. S. & ESSENBERG, R. C. Tick salivary gland physiology. *Annual Review of Entomology*, 40: 245-67, 1995.
- SEIXAS, A., LEAL, A. T., NASCIMENTO-SILVA, M. C., MASUDA, A., TERMIGNONI, C. & DA SILVA VAZ, I., Jr. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124: 332-40, 2008.
- SHPYNOV, S. N., RUDAKOV, N. V., IASTREBOV, V. K., LEONOVA, G. N., KHAZOVA, T. G., EGOROVA, N. V., BORISOVA, O. N., PREIDER, V. P., BEZRUKOV, G. V., FEDOROV, E. G., FEDIANIN, A. P., SHERSTNEVA, M. B., TURYSHEV, A. G., GAVRILOV, A. P., TANKIBAEV, M. A., FOURNIER, P. E. & RAOULT, D. [New evidence for the detection of Ehrlichia and Anaplasma in ixodes ticks in Russia and Kazakhstan]. *Medicinska parazitologija in parazitarne bolezni (Mosk)*, 10-4, 2004.
- SIMO, L., ZITNAN, D. & PARK, Y. Neural control of salivary glands in ixodid ticks. *Journal of Insect Physiology*, 58: 459-66, 2012.
- 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: 7, 2008.

- SOMERVILLE, R. P., LONGPRE, J. M., JUNGERS, K. A., ENGLE, J.M., ROSS, M., EVANKO, S., WIGHT, T. N., LEDUC, R. & APTE, S. S. Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11): 9503-13, 2003.
- SONENSHINE, D. E., KOCAN, K. M. & DE LA FUENTE, J. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends in Parasitology*, 22: 550-1, 2006.
- SOSSAI, S., PECONICK, A. P., SALES-JUNIOR, P. A., MARCELINO, F. C., VARGAS, M. I., NEVES, E. S. & PATARROYO, J. H. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*, 37: 199-214, 2005.
- SOTILLOS, S., ROCH, F. & CAMPUZANO, S. The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Development*, 124: 4769-79, 1997.
- SRIVASTAVA, S. C. & VARMA, M. G. R. The culture of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Ixodidae) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*, 1: 154-157, 1964.
- STÖCKER, W., GRAMS, F., BAUMANN, U., REINEMER, P., GOMIS-RÜTH, F. X., MCKAY, D.B. & BODE, W. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Science*, 4(5): 823-840, 1995.
- TANJONI, I., BUTERA, D., BENTO, L., DELLA-CASA, M. S., MARQUES-PORTO, R., TAKEHARA, H. A., GUTIÉRREZ, J.M., FERNANDES, I. & MOURA-DASILVA, A. M. Snake venom metalloproteinases: structure/ function relationships studies using monoclonal antibodies. *Toxicon*, 42(7): 801-8, 2003.
- TIKKI, N., RHALEM, A., SADAK, A. & SAHIBI, H. Female tick *Hyalomma marginatum marginatum* salivary glands: preliminary study on protein changes during feeding process and antigens recognized by repeatedly infested cattle. *Parasite*, 6: 303-9, 1999.

- UMEMIYA-SHIRAFUJI, R., BOLDBAATAR, D., LIAO, M., BATTUR, B., RAHMAN, M. M., KUBOKI, T., GALAY, R. L., TANAKA, T. & FUJISAKI, K. Target of rapamycin (TOR) controls vitellogenesis via activation of the S6 kinase in the fat body of the tick, *Haemaphysalis longicornis*. *International Journal for Parasitology*, 42: 991-8, 2012.
- VALENZUELA, J. G., FRANCISCHETTI, I. M., PHAM, V. M., GARFIELD, M. K., MATHER, T. N. & RIBEIRO, J. M. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of Experimental Biology*, 205: 2843-64, 2002.
- VAUGHAN, J. A., SONENSHINE, D. E. & AZAD, A. F. Kinetics of ingested host immunoglobulin G in hemolymph and whole body homogenates during nymphal development of *Dermacentor variabilis* and *Ixodes scapularis* ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 27: 329-40, 2002.
- WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animal. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 401-109, 1978.
- WEISS, B. L., & KAUFMAN, W. R. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16): 5874-9, 2004.
- WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, 129: 367-87, 2004.
- WILLADSEN, P. Tick control: thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology*, 138: 161-8, 2006.
- WILLADSEN, P., RIDING, G. A., MCKENNA, R. V., KEMP, D. H., TELLAM, R. L., NIELSEN, J. N., & LAHNSTEIN, J., COBON, G. S. & GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *Journal of Immunology*, 143(4): 1346-51, 1989.
- WURITU, OZAWA, Y., GAOWA., KAWAMORI, F., MASUDA, T., MASUZAWA, T., FUJITA, H. & OHASHI, N. Structural analysis of *ap44/msp2* expression site of *Anaplasma phagocytophilum* in naturally infected ticks in Japan. *Journal of Medical Microbiology*, 58: 1638-44, 2009.

YAMADA, S., KONNAI, S., IMAMURA, S., ITO, T., ONUMA, M. & OHASHI, K.

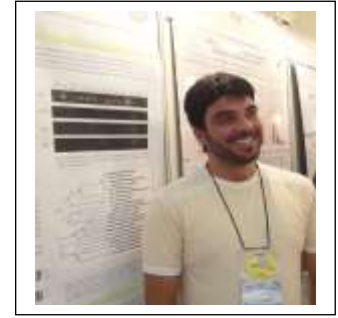
Cloning and characterization of *Rhipicephalus appendiculatus* voraxinalpha and its effect as anti-tick vaccine. *Vaccine*, 27(43): 5989-97, 2009.

ZHU, G. Z., LIN, Y., MYLES, D. G. & PRIMAKOFF, P. Identification of four novel

ADAMs with potential roles in spermatogenesis and fertilization. *Gene*, 234: 227-37, 1999.

8. Curriculum Vitae

Quickly after the defense of MSc thesis in 2009, I win scholarship from TWAS-CNPq, to conduct Ph.D. at the CBIot, Federal Univer-



sity of Rio Grande do Sul, Brazil. Since enormous economic losses of livestock are caused by ticks and ticks transmitted infections on a global scale, establishment of effective preventive measures to control these infections is a crucial issue in order to maintain maximum food production in the restricted spaces we have on the earth. For this reason, I currently focused my research activities on the development of novel anti-tick vaccine or therapeutic strategies (using antibody or recombinant protein) against hematophagous arthropods. During PhD, along with laboratory I also done field work, I also carried out several courses with professor from international community including United States and Japan. I have presented my work in national and international conferences and most of PhD research work has been submitted for publication in peer-reviewed journals. In the future, I intend to continue my research focusing on vaccine development against hematophagous vectors and control tools for their disease transmission.

Awards

- ❖ Young scientists award for third world countries, TWAS-CNPq. 2010.
- ❖ Best abstract award-Milan Italy, United States Department of Agriculture Agricultural Research Service National Animal Disease Center. 2013.
- ❖ Top-10 research work (Related area), XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia-2013.

Peer reviewed publication

- ❖ Reprolysin metalloproteases from *Ixodes persulcatus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus microplus* ticks. **Applied and Experimental Acarology**.
- ❖ Immunoprotective potential of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* metalloprotease. **Veterinary Parasitology**.

Patent

- ❖ Metalloprotease antigens or peptides derivativos for tick control. Instituto Nacional de Propriedade Industrial (Brazil). Application number (BR 10 2013 019135-3).

Invited speaker

- ❖ XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia. 2013.
- ❖ XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. 2012.

Conferences/ Workshops

- ❖ Ali et al., XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* metalloprotease: immune-protection against tick infestation. 2013.
- ❖ Ali et al., International Veterinary Immunology Symposium. Putative reprolysin metalloproteases from ticks *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes persulcatus* and *Rhipicephalus microplus*. 2013.
- ❖ Tirloni et al., XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). *Rhipicephalus microplus* Serpin-3 (RmS-3): a Salivary Serpin. 2013.

- ❖ Ali et al., XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. Cloning and Characterization of *Boophilus microplus* Metalloproteases Genes. 2012.
- ❖ Ali et al., XLI Annual Meeting of SBBq. Foz do Iguaçu. XLI Annual Meeting of SBBq, 2012. A family of serine protease inhibitors (serpins) from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 2012.
- ❖ Ali et al., XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Identification of new metalloproteaseencoding genes in *Ixodes persulcatus*. 2012.
- ❖ Tirloni et al., XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Serine proteinase inhibitors (serpins) in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: identification, characterization and recombinant expression. 2012.
- ❖ Ali et al., XIV Encontro Anual do PPGBCM. Characterization of metalloproteases from *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Ixodes persulcatus*. 2012.
- ❖ Ali et al., XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Identification and characterization of serpins from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 2012.
- ❖ Ali et al., XL Reunião Anual da SBBq. Cloning and Partial Characterization of *Boophilus microplus* metalloprotease (MP1, MP2, and MP5) Genes from Cattle tick. 2011.
- ❖ Ali et al., XII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Cloning and Partial Characterization of *Boophilus* metalloprotease (MP1, MP2, and MP5) Genes from Cattle tick. 2011.

- ❖ Ali et al.,Xii Reuniao Anual do Programa de PosGraduacao em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotechnologia da UFRGS.Serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: cloning and expression. 2011.
- ❖ Ali et al., XIV Arthromint Brazil. Cloning of metalloproteases from tick *Rhipicephalus microplus*. 2010.

Events organized

- ❖ VII Summer course at The Pos-graduate Program in Cellular and Molecular Biology, UFRGS, 2012.

Gen Bank submission

- ❖ KF874600.
- ❖ KF874601.
- ❖ KF874602.
- ❖ KF874603.
- ❖ KF874604.
- ❖ KF874605.
- ❖ KF874606.
- ❖ KF874607.
- ❖ KF874608.
- ❖ KF874609.