MARIA FERNANDA BANDEIRA DE MELO GALLETTI

**EFEITOS DA TEMPERATURA E DA ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA
SOBRE O PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE
Rickettsia rickettsii DURANTE A INFECÇÃO
DO CARRAPATO-VETOR *Amblyomma aureolatum***

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

São Paulo
2013

MARIA FERNANDA BANDEIRA DE MELO GALLETTI

**EFEITOS DA TEMPERATURA E DA ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA
SOBRE O PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE
Rickettsia rickettsii DURANTE A INFECÇÃO
DO CARRAPATO-VETOR *Amblyomma aureolatum***

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Cristina Fogaça

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Galletti, Maria Fernanda Bandeira de Melo.

Efeitos da temperatura e da alimentação sanguínea sobre o perfil de expressão gênica de *Rickettsia rickettsii* durante a infecção do carrapato-vetor *Amblyomma aureolatum* / Maria Fernanda Bandeira de Melo Galletti. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Cristina Fogaça.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia da interação carrapato-riquetsia.

Versão do título para o inglês: Effects of the temperature and blood feeding on the gene expression profile of *Rickettsia rickettsii* during infection of its tick vector *Amblyomma aureolatum*.

1. *Rickettsia rickettsii* 2. Febre Maculosa 3. Carrapato 4. Elevação de temperatura 5. Alimentação sanguínea 6. Transcriptoma
I. Fogaça, Profa. Dra. Andréa Cristina II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0141/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria Fernanda Bandeira de Melo Galletti.

Título da Tese: Efeitos da temperatura e da alimentação sanguínea sobre o perfil de expressão gênica de *Rickettsia rickettsii* durante a infecção do carrapato-vetor *Amblyomma aureolatum*.

Orientador(a): Profa. Dra. Andréa Cristina Fogaça.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização molecular das interações entre o carrapato-vetor e o agente etiológico da febre maculosa, *Rickettsia rickettsii*", protocolado sob o nº1423/2008, utilizando 12 (doze) cobaias, 06 (seis) coelhos e 02 (dois) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 18 de junho de 2008.

We certify that the Research "Molecular characterization of the interaction between the tick vector and *Rickettsia rickettsii*, the etiological agent of Brazilian spotted fever", protocol number 1423/2008, utilizing 12 (twelve) cobaias, 06 (six) habits and 02 (two) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/18/08.

São Paulo, 19 de junho de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **128** nas fls. **109** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Andréa Cristina Fogaça**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Caracterização molecular das interações entre o carrapato-vetor e o agente etiológico da febre maculosa, Rickettsia rickettsii*" do qual participam o(s) aluno(s) **Maria Fernanda Bandeira de Melo Galletti, Camila Dantas Malossi e os pesquisadores Sirlei Daffre, Marcelo Bahia Labruna, Adriano Pinter**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **20.09.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 22 de setembro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais, Aline e José Roberto, que durante toda a vida dedicaram-me amor e apoio irrestrito para a realização de todos os meus sonhos e conquistas.

Ao meu grande amor, meu amado esposo Silvio, pelo apoio incondicional durante todos os momentos dessa jornada.

À minha irmã, Maria Carolina, pelo exemplo de força e caráter.

Eles são os meus exemplos de respeito, capacidade intelectual e profissionalismo. Sem esse apoio eu não estaria preparada para tantos desafios.

AGRADECIMENTOS

Confesso que após um longo período de trabalho criativo para compor a tese e seus grandes frutos, me sinto bloqueada para redigir os agradecimentos. Talvez pelo fato de eu me sentir tão grata e maravilhada com tudo que me aconteceu durante o doutoramento. Perdi o fôlego por diversas vezes, por motivos angustiantes ou extremamente bons e novamente fico sem ar, mas desta vez para agradecer. Como dizer a todos o quanto eu reconheço cada ajuda que me foi dada?

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha querida orientadora Profa. Dra. Andréa Cristina Fogaça, uma das figuras mais marcantes que conheci. Agradeço a oportunidade de ter desfrutado da sua habilidade intelectual durante todos esses anos. Agradeço também todo o incentivo e estímulo para que eu amadurecesse muito pessoal e profissionalmente. Sempre será um grande exemplo profissional para mim. Agradeço os momentos de paciência, de diabruras experimentais, de devaneios teóricos e de direcionamento ao “planeta terra”, quando necessário. Sem o seu apoio, ajuda e dedicação nada disso teria valido a pena.

Às minhas companheiras de grupo, Camila Malossi e Larissa Martins que nos anos de convivência me mostraram como construir uma base sólida de confiança profissional.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Sirlei Daffre por todo o aprendizado.

Aos nossos colaboradores diretos, Prof. Dr. Marcelo Labruna e Dr. Adriano Pinter pela dedicação e disposição para contribuir com o trabalho *in vivo* e Prof. Dr. André Fujita e Dr. Milton Nishiyama por toda a paciência e ajuda estatística.

Aos membros do nosso laboratório, Eliane Esteves, Thaís Bifano, Rafael Rosa, Paula Pohl, Sandra Kalil, Janaina Peixoto, Suzana Pessoa, José Mário Balanco, Claudia Angeli e Gustavo Zoppello pelo apoio diário, dedicação e disposição para contribuir com o meu trabalho.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, por todo auxílio durante os experimentos *in vivo*.

Ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelo apoio estrutural e burocrático.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de SP (FAPESP) e pela concessão da bolsa (2009/50137-7) e apoio financeiro.

Sem o apoio e carinho de todas essas pessoas citadas, além de tantas não mencionadas, essa jornada não teria a mesma importância.

A Deus pela vigilância constante!

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

Albert Einstein (1879 - 1955)

RESUMO

GALLETTI, M. F. B. M. **Efeitos da temperatura e da alimentação sanguínea sobre o perfil de expressão gênica de *Rickettsia rickettsii* durante a infecção do carrapato-vetor *Amblyomma aureolatum*.** 2013. 148 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2013.

Rickettsia rickettsii é o agente etiológico da febre maculosa das Montanhas Rochosas, a mais letal dentre as riquetsioses que acometem o homem. A principal espécie de carrapato-vetor de *R. rickettsii* na área metropolitana da cidade de São Paulo é *Amblyomma aureolatum*. Quando um carrapato em jejum no solo encontra um hospedeiro vertebrado e inicia a alimentação sanguínea, *R. rickettsii* é exposta a uma elevação da temperatura e aos componentes da refeição sanguínea. Ambos os estímulos foram previamente associados à reativação da virulência da bactéria em carrapatos, porém, os fatores responsáveis por essa conversão do fenótipo avirulento em virulento não foram completamente elucidados até o momento. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo determinar os efeitos desses dois estímulos ambientais sobre o perfil de expressão gênica dessa bactéria durante a infecção de *A. aureolatum*. Inicialmente, estabelecemos um sistema de propagação de riquetsias para obter material genético suficiente para a padronização dos procedimentos de preparação de amostras para os experimentos de microarranjos. Para tal, estabelecemos, pela primeira vez, a infecção de uma cepa patogênica brasileira de *R. rickettsii* em células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BME26). Através da utilização de microarranjos de oligonucleotídeos customizados, analisamos os efeitos da elevação da temperatura em 10°C e da alimentação sanguínea sobre o perfil transcricional da bactéria infectando o conjunto de órgãos de fêmeas de *A. aureolatum*. Esse é o primeiro estudo da expressão gênica global de uma bactéria do gênero *Rickettsia* infectando um carrapato-vetor natural. Apesar de ambos os estímulos terem promovido um aumento da carga bacteriana, a alimentação sanguínea teve um efeito maior, também modulando cinco vezes mais genes que a elevação da temperatura. Dentre os genes induzidos, alguns codificam fatores de virulência, tais como componentes do sistema de secreção do tipo IV (T4SS), sugerindo que esse importante sistema de secreção bacteriano seja utilizado para secretar efetores durante a ingestão de sangue pelo carrapato. Através de análises *in silico* de domínios conservados das proteínas hipotéticas, identificamos outros componentes do T4SS de *R. rickettsii* ainda não descritos na literatura. A alimentação sanguínea também induziu a expressão de genes codificadores de enzimas antioxidantes, o que pode corresponder a uma tentativa de *R. rickettsii* de se proteger contra os efeitos deletérios de radicais livres produzidos pelos carrapatos alimentados. Por fim, analisamos a transcrição de uma seleção de genes de *R. rickettsii* em glândulas salivares e intestinos de carrapatos machos e fêmeas através de RT-qPCR microfluídica. Os resultados mostraram que a elevação da temperatura e a alimentação modulam um conjunto específico de genes em cada tecido analisado, tendo sido possível definir-se assinaturas transcricionais tecido-específicas. Os genes diferencialmente expressos identificados neste estudo devem ser caracterizados funcionalmente, podendo ser considerados como futuros alvos para o desenvolvimento de vacinas.

Palavras-chave: *Rickettsia rickettsii*. Febre Maculosa. Carrapato. Elevação de temperatura. Alimentação sanguínea. Transcriptoma. Microarranjos. RT-qPCR. Assinatura transcricional.

ABSTRACT

GALLETTI, M. F. B. M. **Effects of the temperature and blood feeding on the gene expression profile of *Rickettsia rickettsii* during infection of its tick vector *Amblyomma aureolatum*.** 2013. 148 p. Ph. D. thesis (Doctorate in Biology of Host-Pathogen Relation) – University of São Paulo, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo, 2013.

Rickettsia rickettsii is the causative agent of Rocky Mountain Spotted Fever, which is the most lethal spotted fever rickettsiosis that affects humans. The main tick species that transmits *R. rickettsii* in the metropolitan area of São Paulo's city is *Amblyomma aureolatum*. When an infected and starving tick begins blood feeding from a vertebrate host, *R. rickettsii* is exposed to a temperature elevation and to components in the blood meal. These two environmental stimuli have been previously associated with the reactivation of rickettsial virulence in ticks, but the factors responsible for this phenotype conversion have not been completely elucidated. The main aim of the present work was to determine the effects of these two environmental stimuli on the *R. rickettsii* transcriptional profile during *A. aureolatum* infection. We initially established an effective system for rickettsia propagation to generate a substantial quantity of genetic material for microarray standardization. For that, for the first time, we established an *in vitro* infection of the virulent Brazilian *R. rickettsii* strain in the BME26 tick embryonic cell line from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Using customized oligonucleotide microarrays, we analyzed the effects of a 10°C temperature elevation and a blood meal on the transcriptional profile of *R. rickettsii* infecting whole organs of *Amblyomma aureolatum* female ticks. This is the first bacterial transcriptome study of the *Rickettsia* genus when infecting a natural tick vector. Although both stimuli significantly increased the bacterial load, blood feeding had a greater effect, also modulating five-fold more genes than the temperature upshift. Among the genes induced by blood-feeding, some encode virulence factors, such as Type IV Secretion System (T4SS) components, suggesting that this important bacterial transport system is used to secrete effectors during the acquisition of the blood meal by the tick. Using an *in silico* conserved domain analysis of hypothetical proteins, we identified additional T4SS components of *R. rickettsii* that were never previously described. Blood-feeding also up-regulated the expression of antioxidant enzymes, which might correspond to an attempt by *R. rickettsii* to protect itself against the deleterious effects of free radicals produced by fed ticks. Finally, we studied the transcriptional profile of selected genes of *R. rickettsii* on the salivary glands and midguts of male and female ticks by microfluidic RT-qPCR. Results showed that temperature upshift and blood feeding modulate specific sets of genes in each tissue, allowing for the establishment of a tissue-specific transcriptional signature. The modulated genes identified in this study require further functional analysis and may have potential as future targets for vaccine development.

Keywords: *Rickettsia rickettsii*. Rocky Mountain Spotted Fever. Tick. Elevation of temperature. Blood feeding. Transcriptome. Microarray. RT-qPCR. Transcriptional signature.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração da infecção de carrapatos ixodídeos por <i>R. rickettsii</i> e da transmissão da bactéria para o hospedeiro vertebrado.....	24
Figura 2 – Fluxograma dos quatro diferentes procedimentos utilizados para a preparação das amostras de cDNA para a hibridização nos microarranjos.....	41
Figura 3 – Observação de células BME26 infectadas com <i>R. rickettsii</i> por microscopia ótica.....	51
Figura 4 – Curva de crescimento de <i>R. rickettsii</i> em células BME26.....	52
Figura 5 – Imagem gerada pelo escaneamento dos microarranjos de oligonucleotídeos após a hibridização com amostras de cDNA de <i>R. rickettsii</i> preparadas com diferentes procedimentos.....	53
Figura 6 – Níveis de infecção em órgãos totais de carrapatos <i>A. aureolatum</i> adultos.....	55
Figura 7 - Classificação funcional das CDS de <i>R. rickettsii</i> moduladas pelo aumento da temperatura de incubação de 25 °C para 35 °C durante a infecção de fêmeas de <i>A. aureolatum</i>	57
Figura 8 - Classificação funcional das CDS de <i>R. rickettsii</i> moduladas pela alimentação sanguínea de fêmeas de <i>A. aureolatum</i> infectadas.....	61
Figura 9 - Efeitos da temperatura sobre o perfil de expressão gênica de <i>R. rickettsii</i> infectando glândulas salivares (SG) e intestinos (MG) de machos e fêmeas de <i>A. aureolatum</i>	72
Figura 10 - Assinatura gênica tecido-específica de <i>R. rickettsii</i> quando exposta à elevação da temperatura em 10 °C.....	75
Figura 11 - Efeitos da alimentação sanguínea sobre o perfil de expressão gênica de <i>R. rickettsii</i> infectando glândulas salivares (SG) e intestinos (MG) de machos e fêmeas de <i>A. aureolatum</i>	77
Figura 12 - Assinatura gênica tecido-específica de <i>R. rickettsii</i> quando exposta à alimentação sanguínea.....	80
Figura 13 - Assinatura gênica tecido-específica de <i>R. rickettsii</i> exposta à elevação da temperatura e à alimentação sanguínea simultaneamente.	84
Figura 14 - Localização e orientação dos genes codificadores de componentes do T4SS reprimidos (A) ou induzidos (B) pela alimentação sanguínea no cromossomo de <i>R. rickettsii</i>	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Programa térmico das qPCR realizadas no equipamento BioMark (Fluidigm Corporation).....	49
Tabela 2 – CDS de <i>R. rickettsii</i> com função anotada moduladas pela elevação da temperatura de incubação do carrapato vetor de 25 °C para 35 °C.....	58
Tabela 3 – CDS de <i>R. rickettsii</i> com função anotada induzidas pela alimentação sanguínea do carrapato.....	62
Tabela 4 – CDS de <i>R. rickettsii</i> com função anotada reprimidas pela alimentação sanguínea do carrapato.....	63
Tabela 5 – Análise de similaridade de proteínas hipotéticas moduladas pelo aumento de temperatura de incubação de 25 °C a 35 °C.....	66
Tabela 6 – Análise de similaridade de proteínas hipotéticas induzidas pela alimentação sanguínea.....	67
Tabela 7 – Análise de similaridade de proteínas hipotéticas reprimidas pela alimentação sanguínea.	68
Tabela 8 – Validação dos dados de modulação dos microarranjos por RT-qPCR. ..	69
Tabela 9 – CDS de <i>R. rickettsii</i> diferencialmente expressas pela exposição à elevação de temperatura em tecidos de <i>A. aureolatum</i> adultos. A análise transcricional foi realizada por RT-qPCR microfluídica.....	73
Tabela 10 – CDS de <i>R. rickettsii</i> diferencialmente expressas pela exposição à alimentação sanguínea nas glândulas salivares de <i>A. aureolatum</i> adultos.....	78
Tabela 11 – CDS de <i>R. rickettsii</i> diferencialmente expressas pela exposição à alimentação sanguínea nos intestinos de <i>A. aureolatum</i> adultos.....	79
Tabela 12 – CDS de <i>R. rickettsii</i> diferencialmente expressas nas glândulas salivares de <i>A. aureolatum</i> adultos pelo efeito aditivo da elevação de temperatura e da alimentação sanguínea.....	82
Tabela 13 – CDS de <i>R. rickettsii</i> diferencialmente expressas no intestino de <i>A. aureolatum</i> adultos pelo efeito aditivo da elevação de temperatura e da alimentação sanguínea.....	83
Tabela 14 – CDS de <i>R. rickettsii</i> expressas em células BME26 incubadas a 34 °C.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aRNA	RNA complementar
BOD	Câmara incubadora para DBO (demanda bioquímica do oxigênio)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar
CDS	Sequencia codificadora
Cy	Cianina
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CDD	<i>Conserved Domain Database</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAg	Ácido desoxirribonucleico genômico
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
g	Medida da gravidade da Terra
GEO	NCBI <i>Gene Expression Omnibus</i>
h	Hora
ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
k	Milhar
L	Litro
LB	Meio Lúria-Bertani
MG	Intestino
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Micromolar
MMDB	<i>Molecular Model Database</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
RNA _m	Ácido ribonucleico (RNA) mensageiro
ng	Nanograma
pb	Pares de bases
pmol	Picomol
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RT- qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa
s	Segundos
SG	Glândula salivar
T4SS	<i>Type Four Secretion System</i>
U	Unidades
UR	Unidade relativa
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Carrapatos e sua importância na transmissão de agentes infecciosos	19
1.2 Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (RMSF)	21
1.3 <i>Rickettsia rickettsii</i> e seus carrapatos vetores	22
1.4 <i>R. rickettsii</i> e hospedeiros amplificadores	24
1.5 Estudos moleculares da interação entre carrapatos e patógenos por eles transmitidos	25
1.5.1 Expressão gênica de carrapatos infectados	25
1.5.2 Reativação da virulência de riquetsias durante a infecção do carrapato-vetor e expressão gênica frente a diferentes condições ambientais	27
2 OBJETIVO	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 <i>Rickettsia rickettsii</i>	33
3.2 Células embrionárias do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (BME26)	33
3.3 Carrapatos	33
3.4 Infecção experimental de células BME26 por <i>R. rickettsii</i>	34
3.4.1 Determinação da curva de crescimento de <i>Rickettsia rickettsii</i> em células embrionárias de carrapatos	35
3.5 Infecção experimental de <i>A. aureolatum</i> por <i>R. rickettsii</i>	36
3.6 Dissecção das glândulas salivares e intestinos de <i>A. aureolatum</i> infectados por <i>R. rickettsii</i>	37
3.7 Isolamento de DNA genômico e RNA total	37
3.8 Quantificação da infecção por <i>R. rickettsii</i>	38
3.8.1 Clonagem de um fragmento de 147 pb do gene da citrato sintase (gltA) de <i>Rickettsia</i> spp.	38
3.8.2 PCR quantitativa	39
3.9 Microarranjos de oligonucleotídeos	40
3.9.1 Montagem e confecção	40
3.9.2 Síntese e marcação de cDNA	40
3.9.2.1 Padronização dos procedimentos	40

3.9.2.2 Amostras destinadas à determinação da expressão gênica diferencial de <i>R. rickettsii</i>	42
3.9.2.3 Hibridização, lavagem e escaneamento.....	43
3.9.2.4 Análise dos dados.....	44
3.10 Análise <i>in silico</i> das CDS de proteínas moduladas pela temperatura e alimentação sanguínea.....	44
3.11 Validação dos dados de microarranjos por reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa (RT- qPCR).....	45
3.11.1 Oligonucleotídeos.....	45
3.11.2 Síntese e amplificação de cDNA.....	45
3.11.3 qPCR.....	45
3.11.4 Análise dos dados.....	46
3.12 Análise do perfil de expressão gênica de <i>R. rickettsii</i> em glândulas salivares e intestinos de carrapatos adultos por RT- qPCR microfluídica	46
3.12.1 Oligonucleotídeos.....	47
3.12.2 Síntese e amplificação de cDNA.....	47
3.12.3 qPCR.....	48
3.12.4 Análise dos dados.....	49
4 RESULTADOS	50
4.1 Determinação do perfil de expressão gênica global de <i>Rickettsia rickettsii</i> por microarranjos de oligonucleotídeos	50
4.1.1 Padronização dos procedimentos para a síntese e marcação de cDNA.....	50
4.2 Efeitos de estímulos ambientais sobre o perfil transcricional de <i>R. rickettsii</i> infectando carrapatos <i>Amblyomma aureolatum</i>	54
4.2.1 Infecção experimental de carrapatos	54
4.2.2 Efeitos da temperatura sobre o perfil de expressão gênica global de <i>R. rickettsii</i>	55
4.2.3 Determinação dos efeitos da alimentação sobre o perfil de expressão gênica global de <i>R. rickettsii</i>	59
4.3 Caracterização <i>in silico</i> das proteínas hipotéticas moduladas pela temperatura e alimentação sanguínea	65
4.4 Confirmação do perfil de expressão de <i>R. rickettsii</i> infectando fêmeas de <i>A. aureolatum</i>.....	69

4.5 Perfil de expressão de genes de <i>R. rickettsii</i> modulados pela temperatura e alimentação sanguínea em glândulas salivares e intestinos de carrapatos <i>A. aureolatum</i>	70
4.6 Expressão gênica de <i>R. rickettsii</i> em células BME26	84
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS.....	99
APÊNDICES	113
APÊNDICE A - Oligonucleotídeos utilizados na validação dos dados de expressão gênica de <i>R. rickettsii</i> obtidos nos microarranjos.....	113
APÊNDICE B - Oligonucleotídeos utilizados na validação dos dados de expressão gênica de <i>R. rickettsii</i> obtidos nos microarranjos.....	114
APÊNDICE C - Proteínas hipotéticas de <i>R. rickettsii</i> moduladas pela mudança de temperatura em 10 °C.	117
APÊNDICE D - Proteínas hipotéticas de <i>R. rickettsii</i> induzidas pela alimentação sanguínea.....	118
APÊNDICE E - Proteínas hipotéticas de <i>R. rickettsii</i> reprimidas pela alimentação sanguínea.....	119
APÊNDICE F – Artigo de Periódico.....	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carrapatos e sua importância na transmissão de agentes infecciosos

Os carrapatos são artrópodes que apresentam um hábito de vida parasitário, alimentando-se obrigatoriamente do sangue e/ou da linfa de animais vertebrados. Além do desconforto e lesões ocasionadas pela picada, o hospedeiro pode ser acometido por paralisia e, no caso de grandes infestações, anemia (Sonenshine, 1991). Além disso, os carrapatos são vetores de uma ampla diversidade de patógenos como vírus, bactérias e protozoários, os quais, por sua vez, podem ocasionar doenças severas tanto ao homem quanto a outros animais (Colwell et al., 2011; Dantas-Torres et al., 2012; Jongejan, Uilenberg, 2004; Nicholson et al., 2010; Piesman, Eisen, 2008; Sonenshine, 1991).

Esses ectoparasitas estão subdivididos em três famílias: Nuttalliellidae, Argasidae e Ixodidae. (Horak et al., 2002; Keirans, Durden, 2001; Nava et al., 2009). A família Nuttalliellidae é a menor descrita, representada por apenas um gênero de carrapatos, *Nuttalliella*, com pouca descrição e estudos reportados na literatura (Horak et al., 2002; Latif et al., 2012; Mans et al., 2012). Diferentemente, mais de 900 espécies das famílias Argasidae e Ixodidae, já foram descritas (Nava et al., 2009). Os membros dessas duas últimas famílias se diferenciam por inúmeras características metabólicas e morfológicas (Barker, Murell, 2004). Carrapatos argasídeos têm como característica a ausência de um escudo dorsal quitinoso e, por isso, são conhecidos como “carrapatos moles”. Têm fases de vida parasitária curtas (de minutos a algumas horas) e podem permanecer por longos períodos no ambiente, mesmo sob condições hostis, sem se alimentar. Além disso, apresentam estádios de ovo, larva, vários estádios de ninfa (de dois a oito) e, no estágio adulto, realizam várias cópulas e ovipõem uma pequena coleção de ovos (algumas centenas) após cada repasto sanguíneo (Kopacek et al., 2010). Dois gêneros são comumente associados a infestações de humanos e animais, *Argas* e *Ornithodoros*, responsáveis também pela disseminação de vírus e, principalmente, de bactérias do gênero *Borrelia* (Dantas-Torres et al., 2012; Keirans, Durden, 2001). Já os carrapatos ixodídeos possuem tipicamente três estádios de desenvolvimento (larva, ninfa e adultos) e, em sua maioria, dependem da alimentação em três hospedeiros para completar esse ciclo de vida. No estágio adulto, a diferenciação em gêneros é

realizada facilmente através da presença de um escudo quitinoso dorsal completo nos machos e parcial nas fêmeas, dando origem ao nome “carrapatos duros”. Diferentemente dos argasídeos, carrapatos ixodídeos alimentam-se por períodos mais longos, de até três semanas. A fase parasitária é apenas finalizada após o completo ingurgitamento e desprendimento da pele do hospedeiro (Klompen et al., 1996; Mans, Neitz, 2004). Em virtude deste prolongado período de alimentação, os membros da família Ixodidae são vetores de uma grande diversidade de agentes patogênicos (Colwell et al., 2011; Jongejan, Uilenberg, 2004). De fato, nesta família encontram-se diversos gêneros de importância médica humana e veterinária e/ou que acarretam prejuízos econômicos significativos (Dantas-Torres et al., 2012).

As viroses transmitidas por carrapatos que usualmente acometem humanos são divididas em três grupos de acordo com as manifestações clínicas da doença: (i) o grupo das encefalites (Encefalite de Powassan, Encefalite Langat, Encefalite Louping III); (ii) o grupo das febres hemorrágicas (Febre hemorrágica de Omsk, Doença da floresta de Kyasanur e Febre hemorrágica do Congo-Crimeia) e; (iii) o grupo das viroses similares à dengue (Dobler, 2010; Kilpatrick, Randolph, 2012; Piesman, Eisen, 2008). Embora possuam manifestações clínicas distintas, muitas destas doenças são ocasionadas pela mesma família de vírus (Flaviviridae) e possuem em comum um alto grau de letalidade, em torno de 30% (Lasala, Holbrook, 2010).

Diferentemente da grande diversidade de vírus transmitidos por carrapatos, poucos são os protozoários carregados por eles. Ainda assim, o principal representante deste grupo, protozoários do gênero *Babesia*, são altamente patogênicos e acometem tanto humanos quanto outros animais. As babesioses estão distribuídas em todos os continentes. No caso da babesiose bovina, prejuízos pecuários significativos são ocasionados em decorrência da diminuição da produtividade (queda na produção de leite e diminuição do ganho de peso) e aumento da mortalidade no rebanho (Barros et al., 2005; Böse et al., 1995; Suarez, Noh, 2011). A patologia é ainda uma preocupação médico-sanitária, já que, além da transmissão por carrapatos, o patógeno pode ainda ser transmitido via transfusão sanguínea (Schnittger et al., 2012).

Além de vírus e protozoários, as bactérias se destacam como importantes agentes infecciosos transmitidos por carrapatos, com grande impacto socioeconômico. As bactérias transmitidas por carrapatos são subdivididas

essencialmente em quatro grupos, (i) bacilos Gram-negativos, causadores da Tularemia; (ii) erlichias, agentes etiológicos das erlichiose monocítica e erlichiose granulocítica humana; (iii) espiroquetas (borrélias), agentes etiológicos das doença de Lyme e da febre recorrente transmitida por carrapato e, por fim, (iv) riquetsias, causadoras das febres maculosas, com grande potencial fatal (Dantas-Torres et al., 2012; Parola, Raoult, 2006).

1.2 Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (RMSF)

Dentre as riquettsioses transmitidas por carrapatos, a Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (*Rock Mountain Spotted Fever*, RMSF) é a mais severa. A RMSF está amplamente distribuída por diversos países do continente Americano, com casos reportados no Canadá, Estados Unidos (Chapman et al., 2006), México (Zavala-Castro et al., 2006), Costa Rica (Fuentes, 1979; Hun et al., 2008), Panamá (Estripeaut et al., 2007), Colômbia (Hidalgo et al., 2007), Argentina (Paddock et al., 2008; Ripoll et al., 1999) e Brasil (Angerami et al., 2006a, b; Calic et al., 2005; de Lemos et al., 2002). No Brasil, a doença é conhecida como Febre Maculosa Brasileira (FMB) (Labruna, 2009).

A RMSF é uma riquetsiose que acomete o homem e tem desenvolvimento potencialmente fatal (Dantas-Torres, 2007; Nicholson et al., 2010). A doença foi divulgada cientificamente por Wolbach (1919). Na fase inicial, a sintomatologia é caracterizada por uma febre alta repentina, náuseas e vômito. Com a progressão da enfermidade, é possível detectar-se dores musculares e abdominais intensas e, em 60-70% dos casos, podem-se visualizar máculas na superfície corporal, as quais nomeiam a doença (Chapman et al., 2006; Greene, Breitschwerdt, 2006; Dantas-Torres, 2007). A antibioticoterapia específica, a base de tetraciclina e cloranfenicol, pode ser bem sucedida se iniciada imediatamente após a detecção da doença. Entretanto, devido à grande similaridade sintomática com outras doenças mais comuns e a vasta possibilidade de diagnósticos diferenciais, ocorre um retardo do início do tratamento, podendo levar o paciente a óbito (Dantas-Torres, 2007).

No Brasil, a FMB já foi registrada em diversos estados da região Nordeste, Sul, Centro-Oeste, sendo que a maior incidência, com áreas endêmicas, ocorre na região Sudeste. As taxas de letalidade nessas áreas endêmicas oscilam entre 22 e 42%, de acordo com os dados do Ministério da Saúde <<http://portal.saude.gov.br/>

portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1555>. Somente no Estado de São Paulo, 410 casos foram confirmados laboratorialmente entre 2001 e 2011, sendo que 152 (37,07%) destes foram fatais (Divisão de Zoonoses do Centro de Vigilância Epidemiológica de SP <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_fmb.html>. Em 2011, 19 óbitos decorrentes de FMB foram registrados pelo Ministério da Saúde em São Paulo <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/obitos_febre_maculosa_brasil_1990_2011.pdf>.

1.3 *Rickettsia rickettsii* e seus carrapatos vetores

O agente etiológico da RMSF é a α -proteobactéria intracelular obrigatória, *Rickettsia rickettsii* (Família Rickettsiaceae; Ordem Rickettsiales), a qual é aeróbia, não possui motilidade, nem forma esporos (Hackstadt, 1996; Weiss, 1982). Estes organismos unicelulares têm entre 0,3 e 2 μ m de tamanho e possuem uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos em sua maioria (Hackstadt, 1996).

A distribuição de *R. rickettsii* está restrita ao continente Americano (Chapman et al., 2006) e pode ser correlacionada a presença de diferentes espécies de carrapatos da Família Ixodidae, seus carrapatos vetores (Chapman et al., 2006; Dantas-Torres 2007; Dantas-Torres et al., 2012; Demma et al., 2005; Labruna, 2009). Os carrapatos, então, atuam tanto como reservatórios de *R. rickettsii*, quanto como transmissores da mesma para diferentes espécies de animais e para o homem (Parola et al., 2005). Nos Estados Unidos, os carrapatos *Dermacentor variabilis* e *Dermacentor andersoni* são descritos como principais vetores da bactéria, enquanto no México e em parte do estado americano do Arizona, é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Ainda nos EUA, o carrapato *Amblyomma americanum* já foi apontado como vetor no estado da Carolina do Norte (para revisão, vide Dantas-Torres et al., 2012). Ao longo de parte da América Central e toda a América do Sul, incluindo o Brasil, o carrapato *Amblyomma cajennense* (carrapato-estrela), que apresenta uma resistência considerável aos ambientes inóspitos das regiões áridas e diferentes condições de umidade das áreas temperadas (Estrada-Peña et al., 2004; Szabó et al., 2013), é incriminado como principal vetor (Chapman et al., 2006). Essa espécie também é a principal transmissora de *R. rickettsii* no Brasil, onde está amplamente distribuída (Labruna, 2009). Entretanto, na região metropolitana do estado de São

Paulo, o carrapato *Amblyomma aureolatum* (carrapato amarelo-do-cão) é reconhecido como principal vetor devido às condições ideais (temperatura amena e umidade elevada) para sua proliferação (Labruna, 2009; Labruna et al., 2011; Pinter & Labruna, 2006; Vieira et al., 2004).

Após a ingestão de sangue de um hospedeiro vertebrado infectado, o epitélio intestinal de seu carrapato-vetor é colonizado por *R. rickettsii*, onde a bactéria é amplificada. Em seguida, praticamente todos os tecidos do carrapato são infectados, inclusive as glândulas salivares e os ovários (**Figura 1**). Assim, a bactéria pode ser transmitida da mãe para a prole (transmissão transovariana). Além disso, ocorre transmissão de um estágio para outro, caracterizando uma transmissão transestadial (Burgdorfer, 1988; Labruna et al., 2011; Soares et al., 2012). Intrigantemente, os diferentes tipos de transmissão parecem não ser suficientes para manter altas taxas de prevalência da bactéria nas populações naturais de carrapatos. Segundo estudos de campo realizados nos Estados Unidos e também no Brasil, somente uma pequena parcela de carrapatos encontra-se infectada por *R. rickettsii* nas áreas endêmicas para a RMSF (Burgdorfer, 1988; Foley et al., 2007; Guedes et al., 2005; Labruna, 2009; Ogrzewalska et al., 2012; Pinter, Labruna, 2006; Sangioni et al., 2005). No Brasil, foi relatada uma taxa de apenas 0,89% de infecção em uma população de *A. aureolatum* de Mogi das Cruzes (Pinter, Labruna, 2006) e de 11% na população da mesma espécie de carrapato em São Bernardo do Campo (Ogrzewalska et al., 2012), ambas as cidades do estado de São Paulo. Segundo Burgdorfer (1988) e Niebylski e colaboradores (1999), a baixa prevalência de indivíduos infectados nas populações naturais de carrapatos, mesmo em regiões endêmicas, pode ser associada a menores taxas reprodutivas e de sobrevivência, já que os estudos desses autores sugeriram que *R. rickettsii* é patogênica para seus vetores nos Estados Unidos. No Brasil, estudos também apontaram uma diminuição nos parâmetros reprodutivos e de sobrevivência de carrapatos do gênero *Amblyomma* infectados por *R. rickettsii* (Labruna et al., 2011; Soares et al., 2012).

Sendo assim, a caracterização molecular das interações entre *A. aureolatum* e a bactéria *R. rickettsii* faz-se importante, podendo gerar informações relevantes para o esclarecimento dos mecanismos de virulência de *Rickettsia* para carrapatos. Esses dados, por sua vez, podem gerar subsídios para um melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pela baixa prevalência da bactéria nas populações naturais de *A. aureolatum*.

Figura 1 – Ilustração da infecção de carrapatos ixodídeos por *R. rickettsii* e da transmissão da bactéria para o hospedeiro vertebrado.

Fonte: Modificado de Hajdušek e colaboradores (2013).

1.4 *R. rickettsii* e hospedeiros amplificadores

Devido às baixas taxas de prevalência de carrapatos infectados por *R. rickettsii* em áreas endêmicas, a participação de alguns animais vertebrados silvestres como hospedeiros amplificadores tem grande relevância epidemiológica. Estes animais mantêm a bactéria em níveis altos em sua corrente sanguínea por alguns dias ou semanas após a infecção, garantindo a fonte de infecção para carrapatos na natureza (Burgdorfer, 1988; Labruna, 2009; Souza et al., 2009). No Brasil, as capivaras, gambás e cães domésticos são apontados como potenciais hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* (Labruna, 2009; Ogrzewalska et al., 2012). Além disso, estes hospedeiros também possibilitam uma elevação da densidade populacional dos carrapatos.

No entanto, por razões ainda desconhecidas, a interação carrapato vetor-*R. rickettsii*-hospedeiro amplificador não resulta, na maioria das regiões endêmicas, em altas taxas de prevalência do patógeno nas populações de carrapatos vetores. Nessas regiões, como mencionado anteriormente, a prevalência de carrapatos infectados é muito baixa, podendo chegar à zero em alguns períodos analisados

(Burgdorfer, 1988; Fritzen et al., 2011; Guedes et al., 2005; McDade, NewHouse, 1986; Pinter & Labruna, 2006; Sangioni et al., 2005). É provável que o desaparecimento da bactéria da população de carrapatos em determinados períodos seja decorrente de dois fenômenos, (i) ausência de animais sentinelas (equinos e cães) soro-reativos para a bactéria (Cardoso et al., 2006); além do (ii) aumento da virulência da bactéria para o vetor (Burgdorfer, 1988; Niebylski et al., 1999), muito embora os mecanismos para tal fenômeno sejam ainda desconhecidos.

1.5 Estudos moleculares da interação entre carrapatos e patógenos por eles transmitidos

1.5.1 Expressão gênica de carrapatos infectados

R. rickettsii, como descrito anteriormente, é uma bactéria intracelular obrigatória. A patogenicidade de *R. rickettsii* para o hospedeiro vertebrado já está bem caracterizada desde a década de 80 (Walker, 1989). Entretanto, no caso dos hospedeiros invertebrados, especificamente carrapatos *A. aureolatum* e *A. cajennense*, os poucos trabalhos existentes descrevem apenas as consequências danosas desta infecção sobre os parâmetros biológicos de alimentação de fêmeas adultas, oviposição e porcentagem de eclosão dos ovos (Labruna et al., 2011; Soares et al., 2012).

Dentre os poucos trabalhos da literatura que relatam os efeitos da infecção por bactérias do gênero *Rickettsia* sobre os seus carrapatos vetores ao nível molecular, todos foram realizados utilizando-se *R. montanensis* (Ceraul et al., 2007; Macaluso et al., 2003; Macaluso et al., 2006; Mulenga et al., 2003; Sunyakumthorn et al., 2012). Dentre esses trabalhos, Macaluso e colaboradores (2003) compararam a expressão gênica global de carrapatos *D. variabilis* não infectados com a expressão de uma linhagem cronicamente infectada por *R. montanensis*. Através da metodologia de PCR *differential-display*, o trabalho relata que a infecção deflagrou a indução da expressão de diversos genes nos ovários de fêmeas de *D. variabilis*, como genes codificadores de ATPase, α -tubulina, proteína rica em glicina e α -catenina. Dentre essas proteínas, a α -catenina foi caracterizada funcionalmente por Sunyakumthorn e colaboradores (2012) no carrapato *D. variabilis* como atuante na organização do citoesqueleto de actina, processo fundamental para a invasão da

célula hospedeira por microrganismos como riquetsias. Diferentemente do que foi demonstrado por Macaluso e colaboradores (2003), esse trabalho mostrou que ocorre uma modulação negativa dessa molécula em ovários infectados por *R. montanensis*, indicando uma possível tentativa do vetor de impedir a utilização de componentes do seu citoesqueleto para a invasão bacteriana. As reações do carrapato para tentar controlar a invasão bacteriana também foram analisadas por Ceraul e colaboradores (2007). Este estudo avaliou o perfil de expressão de genes codificadores de peptídeos antimicrobianos (duas defensinas e uma lisozima) em carrapatos *D. variabilis* ao longo de uma infecção por *R. montanensis*. Os dados mostraram que a expressão dos genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos foi induzida tanto no intestino quanto no corpo gorduroso dos carrapatos e que o tempo necessário para que essa indução seja deflagrada após a infecção parece depender tanto do tecido quanto do gene analisado.

Embora os trabalhos acima mencionados tenham contribuído para um melhor entendimento da interação *Rickettsia*-carrapato vetor, eles não podem ser extrapolados para uma infecção por *R. rickettsii*, já que *R. montanensis* parece não ser patogênica para os carrapatos, tampouco para humanos e animais domésticos (Ceraul et al., 2007). Assim, a caracterização molecular das interações entre *R. rickettsii* e *A. aureolatum* faz-se fundamental para uma melhor compreensão da FMB.

Diversos estudos envolvendo análises do perfil de expressão gênica de carrapatos infectados por vários outros patógenos também foram previamente reportados: *D. variabilis* infectados pelas bactérias *Borrelia burgdorferi* (Johns et al., 2000) e *Anaplasma marginale* (de la Fuente et al., 2007), *Rhipicephalus appendiculatus* infectados pelo protozoário *Theileria parva* (Nene et al., 2004), *Ixodes ricinus* infectados por *B. burgdorferi* (Rudenko et al., 2005); *Ixodes scapularis* frente ao desafio com *A. marginale* e *A. phagocytophilum* (Zivkovic et al., 2009); *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infectados por *A. marginale* (Zivkovic et al., 2010); *Amblyomma americanum* infectados pela bactéria *Ehrlichia chaffeensis* (Karim et al., 2012) e *I. scapularis* infectados pelo vírus Langat (flavivírus) (McNally et al., 2012). De uma maneira geral, os resultados destes trabalhos demonstraram que a infecção apresenta um efeito modulador sobre a expressão de genes codificadores de proteínas relacionadas com estresse, defesa do carrapato ou para o estabelecimento da infecção.

1.5.2 Reativação da virulência de riquetsias durante a infecção do carrapato-vetor e expressão gênica frente a diferentes condições ambientais

A reativação da virulência de vírus, bactérias e protozoários é um fenômeno comum (Barragan et al., 2008; Gilford, Price, 1955; Reynolds et al., 2008; Spencer, Parker, 1923;) e previamente descrito em *R. rickettsii* infectando carrapatos (Gilford, Price, 1955; Spencer, Parker, 1923). Nesses dois últimos trabalhos, Spencer e Parker (1923) e Gilford e Price (1955) relataram que *R. rickettsii* encontra-se em um estado avirulento em carrapatos em jejum ou mantidos a temperaturas próximas à ambiental, uma vez que a inoculação de homogeneizados de carrapatos nessas condições em cobaias não deflagrou a sintomatologia da infecção. A sintomatologia só foi observada quando carrapatos infectados foram previamente alimentados em um hospedeiro (Gilford, Price, 1955) ou mantidos em temperaturas elevadas (35 °C a 37 °C) (Spencer, Parker, 1923) por 24 a 48 horas e, então homogeneizadas e inoculadas nos animais. Alguns anos mais tarde, Hayes e Burgdorfer (1982) realizaram um estudo de ultraestrutura de *R. rickettsii* em carrapatos, observando diferenças marcantes na membrana das bactérias de carrapatos em jejum em relação às bactérias de carrapatos alimentados. Tais diferenças também foram associadas ao fenômeno de reativação da virulência da bactéria. Além disso, Policastro e colaboradores (1997) demonstraram que a temperatura influencia a expressão proteica de *R. rickettsii* mantida em uma cultura de células *in vitro*. Os autores observaram que proteínas diferentes são expressas pelas bactérias infectando culturas de células mantidas a 28 °C e a 34 °C, sugerindo que este perfil diferencial também ocorra quando as bactérias estão infectando seu carrapato vetor (temperaturas próximas a 28 °C) ou hospedeiros mamíferos (temperaturas próximas a 34 °C).

Embora tenham sugerido que a alimentação sanguínea e a temperatura sejam fatores importantes para a reativação da virulência de *R. rickettsii* em carrapatos, os mecanismos moleculares desta reativação não foram elucidados. Dessa maneira, a determinação da expressão gênica de *Rickettsia* em carrapatos não alimentados e alimentados, bem como de bactérias infectando carrapatos mantidos em diferentes temperaturas, pode gerar dados que permitam inferir se o fenômeno de reativação de *R. rickettsii* é ocasionado por um aumento da temperatura ou se depende de fatores presentes na alimentação sanguínea.

Com o avanço dos estudos genômicos e o desenvolvimento de tecnologias, a análise do perfil de expressão de genes (transcriptoma) de um organismo, tecido ou conjunto de células, nos fornece, atualmente, novas formas de investigar a interação entre patógenos e as células do hospedeiro. Essa é uma importante abordagem para se compreender os mecanismos envolvidos nos mais diversos processos celulares. De fato, a determinação da expressão gênica de um patógeno durante a infecção do vetor ou do hospedeiro pode fornecer informações importantes para o melhor entendimento da relação patógeno-hospedeiro e, dessa forma, vem sendo empregada para o estudo de uma grande diversidade de agentes etiológicos (La et al., 2007).

Uma das tecnologias de análises de transcrição gênica em larga escala disponíveis é o microarranjo. Essa técnica permite a análise quantitativa dos níveis de expressão de milhares de genes simultaneamente (Conway, Schoolnik, 2003; Hughes, Shoemaker, 2001; Leroy, Raoult, 2010; Schulze, Downward, 2001). Além disso, são potentes ferramentas para a utilização da grande quantidade de informações geradas a cada dia pelos projetos de sequenciamento de genomas, auxiliando a caracterização funcional de genes codificadores de proteínas hipotéticas (Pashalidis et al., 2005; Zaini et al., 2008). A metodologia de microarranjos vem sendo amplamente utilizada para a detecção de alterações na expressão gênica de bactérias, uma vez que a regulação ao nível da transcrição desempenha um papel fundamental em procariotos (Ehrenreich, 2006; Lucchini et al., 2001; Ng et al., 2003; Schoolnik, 2002). Dentre os diferentes tipos de microarranjos, aqueles baseados em oligonucleotídeos são os mais utilizados atualmente por apresentarem uma maior especificidade em comparação aos microarranjos baseados em amplicons. Além disso, asseguram uma melhor uniformidade na concentração das sondas e afinidade na hibridização, diminuindo assim, a chance de ocorrerem hibridizações cruzadas (Kreil et al., 2006).

Com a elucidação completa do genoma de várias espécies do gênero *Rickettsia*, hoje é possível utilizar o microarranjo para a análise de expressão gênica em larga escala dessas bactérias. Ellison e colaboradores (2008), por exemplo, realizaram um estudo comparativo da expressão de genes de uma cepa virulenta de *R. rickettsii* (denominada cepa R) com uma cepa avirulenta (Iowa). Essa metodologia também foi utilizada para a determinação dos efeitos da restrição de nutrientes sobre o perfil de expressão gênica de *R. conorii* (La et al., 2007) e de *R. rickettsii* (Ellison et al.,

2009) e dos efeitos da temperatura sobre *R. typhi* (Dreher-Lesnik et al., 2008), *R. prowazekii* (Audia et al., 2008) e *R. rickettsii* (Ellison et al., 2009).

A influência da temperatura tem sido um dos principais agentes ambientais utilizados nos estudos das alterações dos perfis de expressão gênica de bactérias intracelulares em infecções *in vitro* (revisão de Leroy, Raoult, 2010). Essas alterações nos níveis transcricionais de genes auxiliam os microrganismos a se adaptar a um novo ambiente, podendo, conseqüentemente, garantir sua sobrevivência, perpetuando a espécie. Por exemplo, foi demonstrado que a temperatura modula a expressão gênica de *R. typhi*, o agente etiológico do tifo murino, o qual é transmitido por pulgas (Dreher-Lesnik et al., 2008). Interessantemente, os autores observaram que genes codificadores de proteínas de choque térmico e de proteínas envolvidas com o metabolismo bacteriano são reprimidos pela diminuição da temperatura de 37 °C para 25 °C, as quais mimetizam, respectivamente, as temperaturas do hospedeiro vertebrado e do inseto-vetor. O efeito da temperatura sobre o perfil de expressão de genes *spoT* de *R. conorii*, agente etiológico da febre maculosa do Mediterrâneo, foi avaliado por Rovey e colaboradores (2005). Esses genes apresentam múltiplas cópias e estão associados à adaptação gênica da bactéria a estresses. Nesse trabalho, foi demonstrado que a expressão de *spoT1* é induzida pela elevação da temperatura de 10 °C para 37 °C. Audia e colaboradores (2008), em uma análise de transcrição gênica global de *R. prowazekii*, causadora do tifo epidêmico, exposta ao aumento de temperatura de 34 °C para 42 °C, demonstraram que 57% dos genes induzidos são homólogos a genes conhecidamente associados a estresses de temperatura. Em *R. rickettsii*, Ellison e colaboradores (2009) observaram que a expressão gênica de bactérias infectando uma linhagem celular de carrapatos *I. scapularis* (ISE6) mantidas a 37 °C ou a 22 °C não apresenta diferenças expressivas (utilizando *fold change cut-off* >3,0). O mesmo foi observado para bactérias cultivadas em células Vero mantidas a 34 °C ou a 25 °C. A modulação da expressão gênica só foi detectada quando *R. rickettsii* foi cultivada a 34 °C por 3 dias e, em seguida, exposta a uma temperatura de 4 °C por 2 horas (28 genes modulados) ou por 24 horas (56 genes modulados). Interessantemente, os autores observaram que o decréscimo da temperatura de 34 °C para 4 °C reprimiu a expressão de três genes ligados ao enovelamento de novas proteínas sintetizadas, o que justificaria o retardo no crescimento da bactéria a baixas temperaturas. A modulação do perfil de expressão

gênica por variações de temperatura também já foi relatada para outros gêneros de bactérias que acometem o homem, tais como *Mycobacterium tuberculosis* (Stewart et al., 2002), *Borrelia burgdorferi* (Ojaimi et al., 2003; Stevenson et al., 2006; Tokarz et al., 2004), *Yersinia pestis* (Han et al., 2004) e *Listeria monocytogenes* (van der Veen et al., 2007).

Além da temperatura, a carência nutricional já foi descrita como um importante fator de modulação da expressão gênica principalmente de microrganismos intracelulares obrigatórios, os quais são dependentes de nutrientes da célula alvo (Ellison et al., 2009; La et al., 2007; Wike, Burgdorfer; 1972; Winkler, 1990). Especificamente no caso de microrganismos que infectam células de invertebrados que se alimentam de sangue, a ausência ou presença da alimentação sanguínea integral ou parcial desfavoreceu o crescimento e alterou a expressão gênica bacteriana (Ellison et al., 2009; La et al., 2007; Rovey et al., 2005; Spencer, Parker, 1923; Wike, Burgdorfer; 1972;). Ao nível molecular, Rovey e colaboradores (2005) analisaram, além da influência da temperatura, a modulação dos cinco genes *spoT* de *R. conorii* sob um estresse nutricional. Apenas o gene *spoT1* teve transcrição induzida quando o carrapato foi privado de alimentação ou quando células Vero infectadas foram privadas do meio de cultura rico em nutrientes. Assim, os autores associaram a modulação específica de *spoT1* como um sinal para a limitação do crescimento sob carência nutricional. A modulação dos genes *spoT* frente à ausência de nutrientes também foi demonstrada anteriormente em *B. burgdorferi* (Concepcion et al., 1999; Fraser et al., 1997). Ainda em *R. conorii*, foi descrito que a carência nutricional induz a transcrição de genes de virulência, tais como um antígeno de superfície (*sca4*) e quatro componentes do sistema de secreção do tipo IV (*virB4*, *virB9*, *virB10* e *virB11*) (La et al., 2007). A fim de avaliar a influência de componentes sanguíneos na expressão gênica global de *R. rickettsii in vitro*, Ellison e colaboradores (2009) adicionaram um agente quelante de ferro ao cultivo de células Vero e ISE6. Foi detectada uma alteração no crescimento bacteriano e a modulação de cinco genes nesta condição (*fold-change cut-off* > 3,0). Neste caso, todos os genes modulados codificam proteínas hipotéticas e por isso não se conseguiu discutir a relação funcional da variável biológica na expressão deles.

Apesar de terem gerado informações importantes para o conhecimento da interação de riquétsias com seus vetores e/ou hospedeiros, todos os trabalhos acima mencionados foram realizados *in vitro*. Dessa maneira, o estudo da expressão

gênica de *R. rickettsii* infectando seus vetores naturais torna-se necessário, podendo fornecer informações importantes para o melhor entendimento da relação patógeno-hospedeiro, podendo ainda revelar potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas para o controle da RMSF.

Pouco também é conhecido acerca dos efeitos de estímulos ambientais sobre os perfis de expressão gênica de microrganismos, principalmente de bactérias intracelulares obrigatórias, em tecidos específicos dos seus vetores ou hospedeiros. A expressão diferenciada destes organismos em diferentes tecidos podem indicar as adaptações pelas quais os organismos precisam estabelecer baseados no tipo celular em que estão associados. Dentre os poucos trabalhos da literatura, existem relatos da adaptação da espiroqueta *B. burgdorferi* aos tecidos de seus hospedeiros vertebrados mamíferos e também aos seus carrapatos vetores (Narasimhan et al., 2002; Piesman et al., 2003; revisão de Stevenson et al., 2006). Essa adaptação tem como objetivo manter, com sucesso, o seu ciclo de infecção. Durante este ciclo, a bactéria enfrenta diferentes ambientes, usufrui de diversos nutrientes das células hospedeiras e, por fim, consegue evadir do sistema imune de seus hospedeiros. Para isso, a bactéria tem respostas transcricionais diferentes dependendo do desafio que ela encontra em cada ambiente que coloniza (Stevenson et al., 2006). Como mostrado por Piesman e colaboradores (2003), utilizando amostras do carrapato *I. scapularis* alimentados, a expressão gênica de diversas proteínas de membrana foram diferentemente moduladas, dependendo do tecido do carrapato que infectavam. O nível transcricional das proteínas imunomoduladoras de superfícies OspC e OspA foram analisadas. Enquanto a transcrição de *ospC* foi induzida no intestino e nas glândulas salivares do carrapato, *ospA* não foi modulada em intestinos e foi reprimida em glândulas salivares. Baseados nestes resultados, os autores especulam que a expressão diferencial tecidual pode estar relacionada à importância destes genes na dinâmica de infecção no invertebrado e na transmissão da bactéria para o hospedeiro vertebrado. No caso de *R. rickettsii*, ainda não existe nenhum estudo descritivo do efeito molecular tecido-específico da infecção, tanto em células de vertebrados como de invertebrados.

Deste modo, estudos dos efeitos de fatores ambientais sobre a transcrição de *R. rickettsii* em tecidos específicos do vetor também são importantes, podendo gerar subsídios para se estabelecerem, no futuro, estratégias mais eficientes de controle da FMB.

2 OBJETIVO

Com base nos dados da literatura acima apresentados, o objetivo geral deste trabalho foi de avaliar os efeitos da temperatura e da alimentação sanguínea sobre o perfil de expressão gênica de *Rickettsia rickettsii* durante a infecção do carrapato vetor *Amblyomma aureolatum*.

Como objetivos específicos, propusemos:

1. Determinar os efeitos da elevação da temperatura sobre o perfil de expressão gênica de *R. rickettsii* em carrapatos *A. aureolatum* adultos pela metodologia de microarranjos de oligonucleotídeos;
2. Determinar os efeitos da alimentação sanguínea sobre o perfil de expressão gênica de *R. rickettsii* em carrapatos *A. aureolatum* adultos por microarranjos de oligonucleotídeos;
3. Validar os dados obtidos pelos microarranjos através de RT-qPCR;
4. Analisar a expressão de alguns dos genes validados no intestino e nas glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas por RT-qPCR microfluídica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Rickettsia rickettsii*

A cepa de *Rickettsia rickettsii* utilizada neste estudo, denominada Taiaçu, foi originalmente isolada de um espécime do carrapato *A. aureolatum* proveniente do município de Mogi das Cruzes - SP. O homogeneizado deste espécime foi inoculado em cobaias para a amplificação das bactérias. As cobaias foram sacrificadas no pico febril da infecção por *R. rickettsii* e seus órgãos foram dissecados, homogeneizados e armazenados a -80 °C. Este homogeneizado de órgãos foi utilizado para a inoculação de novas cobaias ou para a manutenção das bactérias em uma cultura *in vitro* de células Vero (Pinter, Labruna, 2006).

3.2 Células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BME26)

A linhagem de células embrionárias de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizada neste estudo, denominada de linhagem BME26, foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Sirlei Daffre, ICB-USP. A linhagem foi isolada por Holman e Ronald (1980) e caracterizada por Esteves e colaboradores (2008). Para uso em nossos experimentos, as células foram cultivadas em 5 mL de meio de cultura L-15B300 (Munderloh et al., 1999) suplementado com 5% de soro fetal bovino termo-inativado (Life Technologies, EUA), 10% de meio triptose fosfato (BD Difco, EUA), 0,1% de um concentrado de lipoproteínas bovinas (Life Technologies), 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina (Life Technologies), sendo o pH acertado para 7,2, conforme descrito por (Esteves et al., 2008). As células foram mantidas a 34 °C em incubadora BOD e subcultivadas a cada 20 dias de modo a manterem-se as condições ideais para o seu crescimento.

3.3 Carrapatos

Os carrapatos utilizados neste estudo foram provenientes da colônia de *Amblyomma aureolatum* de Atibaia, São Paulo, mantida no laboratório do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna (FMVZ-USP, São Paulo, SP). Durante as fases de vida

parasitária, os carrapatos foram alimentados em cobaias (*Cavia porcellus*; estágio larval), em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*; estágio de ninfa) e em cães (*Canis familiares*; estágio adulto). Nas fases de vida livre, os carrapatos foram mantidos em incubadora BOD com temperatura ajustada para 25 °C e umidade relativa (UR) de 95%.

3.4 Infecção experimental de células BME26 por *R. rickettsii*

Células BME26 foram cultivadas conforme descrito no item 3.2 até a monocamada atingir cerca de $3,00 \times 10^6$ células. Três dias antes da infecção, o meio de cultura foi substituído por meio sem antibiótico e o pH foi mantido a 7,2 (ideal para as células BME26) ou elevado para 7,4 (ideal para as riquetsias). Paralelamente, um inóculo criopreservado de *R. rickettsii* em células Vero, cedido pelo Prof. Dr. Marcelo B. Labruna (FMVZ-USP), foi descongelado em banho-maria a 37 °C por 3 min. Em seguida, diferentes diluições (1:1, 1:10, 1:100 ou 1:1000, volume/volume) do inóculo foram adicionadas à monocamada de células BME26. Após a inoculação, as garrafas contendo as células foram transferidas para uma BOD a 28 °C ou permaneceram a 34 °C. Logo após a adição do inóculo (tempo 0 h) e após 24, 48, e 72 h do início da infecção, as células de uma garrafa de cada condição analisada foram descoladas pelo uso de um dispositivo *Cell Scraper* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Aliquotas de 1 mL foram utilizadas para a determinação do número de células viáveis e para a visualização das células por microscopia ótica. Aliquotas de 1 mL da suspensão celular também foram centrifugadas a 3.000xg por 5 min a 4 °C, sendo o precipitado celular ressuspensionado em 100 µL de RNA*later* (Life Technologies) e mantido a -20 °C até a extração de ácidos nucleicos (item 3.7). O DNA genômico resultante da extração foi utilizado para a quantificação do número de riquetsias por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) conforme detalhado no item 3.8.

O número de células viáveis por mL foi determinado por contagem em uma câmara de Neubauer após a coloração com uma solução de azul de Tripán a 4%. Para a visualização das células, 100 µL da suspensão foram centrifugados por 5 min contra uma lâmina de vidro, utilizando-se uma citocentrífuga (Fanem, Brasil). As células aderidas às lâminas foram coradas pela utilização de dois métodos diferentes: Gimenez (Garduño et al., 2002) ou Panótico (Instant Prove, Brasil). Na

coloração por Gimenez, as lâminas foram submersas por 2 min em uma solução de fucsina básica 10% e fenol aquoso 4%, enxaguadas com água destilada e submersas, em seguida, em uma solução de verde malaquita 0,8% por duas vezes, com duração de 10 s cada. Para a coloração por Panóptico, seguiu-se o protocolo do fabricante. Após a coloração, as células foram observadas sob microscópio Zeiss–Axiofhot (Zeiss, Alemanha), utilizando-se um aumento de 1000x.

A fim de obter-se um inóculo de *R. rickettsii* em células BME26, os procedimentos acima descritos foram repetidos. Para tal, o inóculo em células Vero (diluição 1:100) foi adicionado a uma monocamada de células em pH 7,2. Após 48h a 34 °C, uma alíquota da suspensão foi removida para a extração de DNA genômico e quantificação do número de riquetsias por qPCR. O restante da suspensão celular foi centrifugado a 3.000xg por 10 min e o precipitado foi ressuspensionado em meio de cultura L-15B300 suplementado (descrito no item 3.2) sem antibiótico e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO), próprio para o congelamento. Essa suspensão foi dividida em alíquotas de 1 mL e armazenada em um container de congelamento programável (Sigma-Aldrich, EUA), seguindo-se o procedimento descrito pelo fabricante. Após congelamento, as alíquotas foram transferidas e armazenadas em nitrogênio líquido até a sua utilização nos experimentos.

3.4.1 Determinação da curva de crescimento de *Rickettsia rickettsii* em células embrionárias de carrapatos

Monocamadas com cerca de $3,00 \times 10^6$ células BME26 em pH 7,2 receberam um inóculo de $9,02 \times 10^6$ riquetsias (obtido conforme descrito no item 3.4) [MOI (*multiplicity of infection*) de 3,0]. Após a inoculação, as garrafas contendo as células foram transferidas para uma BOD a 34 °C. Logo após a adição do inóculo (tempo 0 h) e em intervalos de 12 h (até 60 h), as monocamadas celulares de três garrafas (triplicatas biológicas) foram descoladas pelo uso de um dispositivo *Cell Scraper* (Thermo Fisher Scientific). As células provenientes de cada garrafa foram utilizadas para a contagem do número de células BME26 viáveis por mL (item 3.4) e para a quantificação absoluta do número de *R. rickettsii* por qPCR quantitativo (item 3.8).

3.5 Infecção experimental de *A. aureolatum* por *R. rickettsii*

Primeiramente, os soros de três cobaias foram avaliados através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com antígeno de *R. rickettsii* para atestar que as mesmas não haviam tido contato prévio com esse patógeno (Labruna et al., 2008). Câmaras de tecido de algodão foram afixadas ao dorso previamente tricotomizado de cada animal para a alimentação dos carrapatos, as quais restringem a área de fixação, impedindo a fuga e permitindo um maior controle do processo parasitário. Após 24 h, as cobaias foram inoculadas intraperitonealmente com um homogeneizado de fígado e de baço de uma cobaia previamente sacrificada durante o pico febril da infecção por *R. rickettsii*. Em seguida, as larvas foram depositadas nas câmaras de infestação.

As câmaras foram abertas três vezes ao dia durante um período de 8 a 12 dias para o recolhimento das larvas ingurgitadas, desprendidas naturalmente dos hospedeiros. As larvas foram transferidas para incubadoras BOD para realizar a ecdise para o estágio de ninfa, processo que leva em torno de 20 dias. Após 20 dias adicionais ao término da ecdise para o estágio de ninfa, as mesmas foram alimentadas em coelhos, também através da utilização de câmaras de infestação. As ninfas ingurgitadas foram recolhidas das câmaras e transferidas para incubadoras BOD para a ecdise para o estágio adulto.

Após aproximadamente 60 dias, os carrapatos *A. aureolatum* adultos foram subdivididos em três grupos experimentais. Dois grupos não foram alimentados, tendo sido mantidos em incubadora BOD a 25 °C (grupo 1 – G1) ou a 35 °C (grupo 2 – G2). O outro grupo (grupo 3 – G3) foi alimentado em cães. Após 3 dias de incubação ou de alimentação, os carrapatos foram lavados em PBS (tampão salino fosfato; NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 7,4) estéril e dissecados (item 3.6). Os cães utilizados para a infestação com carrapatos adultos foram monitorados para a infecção por *R. rickettsii*, conforme descrito anteriormente para as cobaias e coelhos.

Todos os animais utilizados para a alimentação dos carrapatos foram monitorados clinicamente para a infecção por *R. rickettsii* durante todo o período de alimentação das ninfas. Além disso, a avaliação sorológica foi realizada nos animais sobreviventes 21 dias após a infestação com carrapatos infectados para a averiguação de soro-conversão, conforme descrito por (Labruna et al., 2007). Os

procedimentos para a experimentação com os animais foram aprovados pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.6 Dissecção das glândulas salivares e intestinos de *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii*

Cada exemplar de carrapato foi transferido para uma base de parafina de cor contrastante (vermelha) com a região dorsal voltada para cima. Quatro incisões na cutícula, nas regiões anterior, posterior e nas duas laterais, foram cuidadosamente realizadas sob lupa estereoscópica binocular (modelo TL-2, Olympus, Japão) com o auxílio de uma lâmina de bisturi. As incisões permitiram que a cutícula dorsal fosse completamente rebatida com o auxílio de uma pinça.

Em seguida, todos os órgãos ou as glândulas salivares e o intestino foram dissecados, lavados em PBS estéril e transferidos para tubos de polipropileno contendo 100 µL de RNA*later* (Life Technologies) para os órgãos e 50 µL para cada intestino ou par de glândulas salivares. Os órgãos foram armazenados a -20 °C até a utilização para a extração de ácidos nucleicos (item 3.7).

3.7 Isolamento de DNA genômico e RNA total

As células BME26 e os órgãos armazenados a -20 °C em RNA*later* (Life Technologies) foram homogeneizados no mesmo reagente com o auxílio de um homogeneizador Potter-Elvehjen. Os homogeneizados foram individualmente submetidos ao isolamento simultâneo de DNA e de RNA pela utilização do Invisorb TwinSpin Cell Mini kit (Invitex, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante. Ao final do procedimento, as concentrações de DNA e de RNA de cada amostra foram determinadas em um espectrofotômetro (modelo NanoDrop-1000, Thermo Fisher Scientific). O RNA total foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% e, após a coloração com brometo de etídeo, a integridade do RNA foi aferida pela visualização em um transiluminador acoplado a um sistema de imagens (modelo ImageQuant™ 300, GE Healthcare, Reino Unido). Para monitoramento da infecção durante as infestações de *A. aureolatum*, os ácidos nucleicos de alguns exemplares de ninfas infectadas e não-infectadas (controle)

também foram extraídos pela mesma metodologia acima descrita. Todas as amostras de DNA e de RNA foram armazenadas a -20 °C e a -80 °C, respectivamente, até a sua utilização nos experimentos.

3.8 Quantificação da infecção por *R. rickettsii*

3.8.1 Clonagem de um fragmento de 147 pb do gene da citrato sintase (*gltA*) de *Rickettsia* spp.

Cinquenta ng do DNA genômico de dois exemplares de carrapatos *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii* foram utilizados como molde para a amplificação de um fragmento de 147 pb do gene da citrato sintase (*gltA*) dessa bactéria. A reação foi realizada utilizando-se 10 pmol dos oligonucleotídeos CS-5 (5'-GAG AGA AAA TTA TAT CCA AAT GTT GAT-3') e CS-6 (5'- AGG GTC TTC GTG CAT TTC TT-3'), 0,5 mM de uma mistura de desoxorribonucleotídeos trifosfatados (dNTP), 2,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), tampão para Taq DNA polimerase diluído para 1x (volume/volume) e 1U de Taq DNA polimerase (Biotools, Espanha), sendo o volume de 20 µL completado com H₂O ultrapura estéril. O programa térmico utilizado foi de 2 min a 95 °C seguidos de 35 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 55 °C e 1 min a 72 °C, o qual foi realizado por um termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Alemanha). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%. Após a coloração do DNA com brometo de etídeo, o mesmo foi visualizado pelo auxílio de um transiluminador acoplado a um sistema de imagens (modelo ImageQuant™ 300, GE Healthcare). A banda referente ao fragmento de 147 pb foi recortada do gel e o DNA nela contido foi purificado pela utilização do Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA), conforme as instruções do fabricante.

O DNA isolado foi submetido a uma reação de ligação com o pGEM® T Easy Vector (Promega), de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante. O produto de ligação foi incubado com uma suspensão de *Escherichia coli* DH5-α por 30 min em banho de gelo, seguidos de 1 min e 30 s a 42 °C e 3 min adicionais em banho de gelo. Após a adição de 400 µL de meio Lúria-Bertani (LB), a suspensão foi incubada por 30 min a 37 °C sob agitação de 300 rpm e, em seguida, semeada em meio LB agar 1,5% contendo IPTG (concentração final de 0,5 mM), X-Gal

(concentração final de 320 µg/L) e ampicilina (concentração final de 50 µg/L). Após 18 h de incubação a 37 °C, três unidades formadoras de colônia (UFC) de coloração branca foram semeadas em 3 mL de meio LB contendo ampicilina (concentração final de 50 µg/L). Após 18 h de cultivo a 37 °C sob agitação de 1.000 rpm, 1,5 mL da suspensão bacteriana foram submetidos a uma centrifugação a 4.000 x g por 10 min a 4°C. O DNA plasmidial do sedimento resultante foi extraído pela utilização do Wizard® Plus SV MiniPreps DNA Purification System (Promega). Após a quantificação, 100 ng do DNA plasmidial foram submetidos ao sequenciamento de nucleotídeos utilizando-se o ABI Prism® dGTP Big Dye Terminator Reaction kit with AmpliTaq® DNA Polimerase (Life Technologies) e 3,2 pmol dos oligonucleotídeos M13 senso (5'GTAAAACGACGGCCAG3') ou M13 antissenso (5'CAGGAAACAGCTATGAC3'). O sequenciamento automático das duas fitas complementares dos três clones foi realizado em um equipamento ABI Prism 310 (Life Technologies). As sequências resultantes foram analisadas pelo programa BioEdit, versão 7.0.9 (Tom Hall, Ibis Biosciences, EUA). Após a confirmação da identidade da sequência obtida com o fragmento de 147 pb da citrato sintase de *R. rickettsii*, diluições do DNA plasmidial foram preparadas para a construção de uma curva-padrão para a quantificação absoluta do número de *R. rickettsii* por PCR quantitativa. O gene *gltA* é um gene de cópia única, permitindo que o número de riquetsias seja quantificado com base no número de cópias do gene identificado em uma amostra.

3.8.2 PCR quantitativa

Para cada reação, 8 pmol de cada um dos oligonucleotídeos CS-5 e CS-6 e 0,5 pmol da sonda interna fluorogênica (5' - 56 FAM - CAT TGT GCC ATC CAG CCT ACG GT - BHQ 1 - 3') foram adicionados a 50 ng de cada amostra de DNA genômico ou a diluições seriadas na base 10 do DNA plasmidial contendo o fragmento do gene *gltA* ($5,30 \times 10^7$ a $5,30 \times 10^2$ cópias). As reações foram realizadas pela utilização do QuantiMix Easy Probes kit (Biotools), de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante. O programa térmico utilizado foi de 2 min a 95 °C seguidos de 50 ciclos de 15s a 95 °C, 15s a 55 °C e 20s a 68 °C, o qual foi realizado por um termociclador para PCR quantitativas (qPCR), modelo

Mastercycler[®] ep realplex2 (Eppendorf). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

3.9 Microarranjos de oligonucleotídeos

3.9.1 Montagem e confecção

Primeiramente, uma lista com as 1.345 CDS (sequências codificadoras) elucidadas pelo sequenciamento completo do genoma da cepa Sheila Smith de *R. rickettsii* (NC_009882) foi submetida ao desenho de oligonucleotídeos. Para tal, foram utilizados os serviços da GE Healthcare, disponíveis através do programa eArray (Agilent Technologies, EUA; <http://earray.chem.agilent.com>). Foi solicitado o desenho de 10 oligonucleotídeos por CDS, sendo gerada uma lista de 13.405 oligonucleotídeos. Em seguida, os filtros de qualidade recomendados pela Agilent Technologies foram aplicados manualmente, gerando uma segunda lista com 13.049 oligonucleotídeos. Os 13.049 oligonucleotídeos representando 99,5% do genoma de *R. rickettsii* (pelo menos 6 oligonucleotídeos por CDS) foram utilizados para a confecção dos microarranjos, formato 8 x 15k, pela Agilent Technologies. Apenas seis genes, que codificam as proteínas hipotéticas A1G_00350, A1G_04065, A1G_06365, A1G_07320 e A1G_02055, além do gene que codifica a enzima pterina-4-alfa-carbinolamina desidratase (PHS) putativa não estão representados. Uma descrição detalhada nos microarranjos pode ser encontrada na base de dados do NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) com o número de acesso GPL16681.

3.9.2 Síntese e marcação de cDNA

3.9.2.1 Padronização dos procedimentos

Primeiramente, avaliamos quatro diferentes procedimentos para a síntese e marcação das amostras de cDNA de *R. rickettsii*. Para esse fim, utilizamos o RNA extraído de células BME26 mantidas a 28 °C ou 34 °C por 48 h após a infecção por *R. rickettsii*. O RNA total de três garrafas (triplicata biológica) de células infectadas de cada condição analisada foi reunido formando uma amostra *pool*. O RNA contido

na amostra *pool* foi tratado com DNase RQ1 (Promega), conforme especificações do fabricante, e utilizado para a síntese e marcação do cDNA.

Três variáveis foram avaliadas: (i) a necessidade da remoção do RNAm eucariótico das amostras para evitar a interferência desse material na marcação do RNAm procariótico, (ii) a necessidade de amplificação do cDNA confeccionado; e (iii) a eficiência de dois diferentes kits de marcação (**Figura 2**).

Figura 2 - Fluxograma dos quatro diferentes procedimentos utilizados para a preparação das amostras de cDNA para a hibridização nos microarranjos.

Para a remoção do RNAm eucariótico, procedimento adotado para a preparação das amostras obtidas pelos procedimentos 1 e 2, utilizamos o kit Oligotex[®] mRNA (QIAGEN, EUA). A síntese de cDNA seguida de amplificação, empregada na preparação das amostras resultantes dos procedimentos 1, 2 e 4, foi realizada pela utilização do Transplex[®] Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma-Aldrich). Após a amplificação, o kit ilustra GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) foi utilizado para a purificação do cDNA, seguindo-se o protocolo do

fabricante. As amostras obtidas pelo procedimento 3 não foram amplificadas e a síntese de cDNA foi realizada com o FairPaly III Labeling Kit (Agilent Technologies).

As concentrações de cDNA de todas as amostras foram determinadas em um espectrofotômetro (modelo NanoDrop-1000, Thermo Fisher Scientific). Quinhentos ng de cDNA de cada amostra foram utilizados para a marcação independente com Cy3 ou Cy5 de modo a obterem-se de réplicas técnicas (*dye swap*). Para a marcação do cDNA das amostras obtidas pelo procedimento 3, utilizamos o Genomic DNA ULS™ (Kreatech's Universal Linkage System) Labeling Kit (Agilent Technologies). O cDNA das demais amostras foi marcado com o FairPaly III Labeling Kit (Agilent Technologies). Todos os procedimentos utilizados neste experimento seguiram as especificações dos respectivos fabricantes.

Após a marcação, as concentrações de cDNA de todas as amostras foram determinadas em um espectrofotômetro (modelo NanoDrop-1000, Thermo Fisher Scientific). As concentrações obtidas foram empregadas para calcular o rendimento de marcação, conforme descrito na fórmula abaixo:

$$\text{Rendimento de marcação} = \frac{340 \times \text{pmol por } \mu\text{L de fluoróforo}}{(\text{ng por } \mu\text{L de cDNA} \times 1000) - \text{pmol por } \mu\text{g de fluoróforo}}$$

As amostras com rendimento de marcação ≥ 825 ng foram utilizadas para a hibridização com os microarranjos de oligonucleotídeos.

3.9.2.2 Amostras destinadas à determinação da expressão gênica diferencial de *R. rickettsii*

Para a análise do perfil transcricional de *R. rickettsii* infectando carrapatos *A. aureolatum*, 200 ng do RNA extraído dos órgãos de sete fêmeas de cada grupo biológico (G1, G2 e G3, descritos no item 3.5), apresentando entre $1,60 \times 10^8$ e $2,20 \times 10^8$ bactérias, foi reunido em uma amostra *pool*. Cada exemplar contribuiu de forma equitativa (200 ng) para a composição da amostra *pool*. Após o tratamento, o RNA resultante foi utilizado como molde para transcrição e amplificação com o MessageAmp™ II-Bacteria Kit Prokaryotic RNA Amplification (Life Technologies),

conforme descrito pelo fabricante. Esse kit tem especificidade para RNA de procariotos e apresentou um rendimento de amplificação superior ao do TransPlex® Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma-Aldrich) utilizado anteriormente.

Em seguida, as concentrações RNA amplificado (aRNA) das amostras foram determinadas em um espectrofotômetro (modelo NanoDrop-1000, Thermo Fisher Scientific). Um µg de aRNA de cada réplica biológica foi marcado independentemente com os fluoróforos Cy3 ou Cy5 (*dye swap*) utilizando-se o Genomic DNA ULS™ (Kreatech's Universal Linkage System) Labeling Kit (Agilent Technologies). O rendimento da marcação foi calculado conforme descrito no item 3.9.2.1. Foram utilizadas duas réplicas biológicas e duas réplicas técnicas (*dye swap*) para cada condição analisada.

O RNA proveniente de carrapatos *A. aureolatum* não infectados foi amplificado conforme descrito anteriormente e utilizado como controle de hibridização não específica com os microarranjos.

3.9.2.3 Hibridização, lavagem e escaneamento

A hibridização e lavagem dos microarranjos seguiram as instruções da Agilent Technologies contidas no manual do FairPlayIII Microarray kit. Resumidamente, cada par de amostras de cDNA a ser analisado foi combinado e aplicado em um microarranjo. Em seguida, as lâminas foram transferidas para um forno de hibridização a 65 °C onde permaneceram por 17 h com rotação a 10 rpm. Ao final do processo de hibridização, as lâminas foram submetidas a lavagens com Wash Buffer 1 e 2 (Agilent Technologies) por 1 min cada, sob agitação branda. O excesso de água foi removido mergulhando-se as lâminas em acetonitrila. Em seguida, as lâminas foram imersas em Stabilization Buffer por 30 s.

Após a lavagem, os microarranjos utilizados para a padronização dos procedimentos de síntese e marcação de cDNA seguiram imediatamente para a varredura no escâner Axon GenePix 4000B (Molecular Devices, EUA). As imagens dos microarranjos foram obtidas com o auxílio do programa GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices). A varredura dos microarranjos utilizados na determinação do perfil de expressão gênica diferencial de *R. rickettsii* foi realizada em um escâner High-Resolution C (Agilent Technologies).

Todas as imagens foram processadas pelo programa Feature Extraction 10.5 (Agilent Technologies). Esse programa analisa se todos os parâmetros de qualidade da marcação e hibridização foram atingidos. O mesmo programa localiza e aplica, automaticamente, a grade para a captação dos dados de fluorescência de cada canal em cada ponto do microarranjo, além de determinar as razões de intensidade de fluorescência entre os canais.

3.9.2.4 Análise dos dados

Após a obtenção dos dados brutos de fluorescência em cada canal pelo software Feature Extraction 10.5 (Agilent Technologies), os mesmos foram normalizados com o algoritmo loess (Ballman et al., 2004). As razões de intensidades normalizadas de G2 (carrapatos não alimentados incubados a 35 °C) *versus* G1 (carrapatos não alimentados incubados a 25 °C) (i) e G3 (carrapatos alimentados) *versus* G2 (carrapatos não alimentados incubados a 35 °C) (ii) foram utilizadas para calcular o *fold-change* (soma dos valores de *fold-change* de todas as sondas representando um gene dividido pelo número total de sondas representando o mesmo gene). Uma CDS foi considerada modulada somente quando 65% das sondas (oligonucleotídeos) exibiram um *fold-change* maior do que 1,5 e menor do que -1,5 nas duas réplicas biológicas e nas duas duplicatas técnicas. As análises dos dados foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. André Fujita (Instituto de Matemática e Estatística, IME - USP).

O conjunto de dados completo de expressão destes experimentos é público e está disponível de acordo com o guia MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*) (Brazma et al., 2001), com número de acesso GSE44349.

3.10 Análise *in silico* das CDS de proteínas moduladas pela temperatura e alimentação sanguínea

As sequências de nucleotídeos de todas as CDS codificadoras de proteínas hipotéticas detectadas como moduladas foram submetidas a uma análise *in silico* contra o banco de dados CDD (*Conserved Domain Database* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) para a identificação de domínios conservados e similaridade com proteínas previamente anotadas. Neste banco de dados, os

alinhamentos são realizados com base nos domínios conservados de proteínas de diferentes organismos, incluindo também domínios descritos por análises tridimensionais da base de dados MMDB (*Molecular Model Database*).

3.11 Validação dos dados de microarranjos por reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa (RT- qPCR)

3.11.1 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos específicos para 17 genes com expressão gênica modulada de acordo com os dados de microarranjos foram desenhados utilizando-se o programa Primer3 4.0 <<http://primer3.wi.mit.edu/>> (Rozen, Skaletsky, 2000) e sintetizados pela empresa Life Technologies (**Apêndice A**).

3.11.2 Síntese e amplificação de cDNA

Um μg do RNA total extraído de órgãos de fêmeas de *A. aureolatum* de cada grupo biológico (G1, G2 e G3, descritos no item 3.5), apresentando entre $1,51 \times 10^8$ e $3,06 \times 10^8$ riquetsias, foi submetido ao tratamento com DNase RQ1 (Promega). Foram utilizadas cinco réplicas biológicas individuais de cada grupo. Após o tratamento, o RNA foi utilizado para as reação de transcrição reversa e amplificação com o kit MessageAmp™ II-Bacteria Kit Prokaryotic RNA Amplification (Life Technologies), conforme descrito anteriormente (item 3.9.2.2).

3.11.3 qPCR

Para cada reação foram utilizados 8 μL do Kit Maxima® SYG Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 10 pmols de cada um dos oligonucleotídeos específicos, 1 μg das amostras de aRNA e quantidade suficiente de água ultrapura autoclavada para completar 16 μL . Utilizamos o termociclador StepOnePlus™ (Life Technologies), com o seguinte programa térmico: 95 °C por 2 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s, 72 °C por 30 s. Previamente às análises de expressão gênica diferencial, a eficiência de cada par de oligonucleotídeos foi determinada avaliando-se a amplificação obtida (Ct) com

diferentes concentrações de aRNA. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

3.11.4 Análise dos dados

A equação de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001) foi aplicada para calcular a expressão relativa de cada gene analisado, sendo que a quantidade de aRNA das amostras foi normalizada de acordo com o nível de expressão do gene codificador da metionil tRNA sintetase. Para a análise dos efeitos da elevação da temperatura, a condição utilizada como calibradora foi G1 e para a análise dos efeitos da alimentação, a condição calibradora foi G2. A identificação das amostras discrepantes (*outliers*) foi realizada considerando-se:

$$< J1 - 1,5 \times dJ$$

$$> J3 + 1,5 \times dJ$$

Onde J (J1, J2, J3) são amostras diferentes e $dJ = J3 - J1$. Em seguida, as medianas foram estatisticamente testadas pelo teste de Wilcoxon.

3.12 Análise do perfil de expressão gênica de *R. rickettsii* em glândulas salivares e intestinos de carrapatos adultos por RT- qPCR microfluídica

Para analisar o efeito da temperatura e da alimentação sanguínea sobre o perfil de expressão de genes de *R. rickettsii* em tecidos específicos (glândulas salivares e intestinos) de fêmeas e de machos de *A. aureolatum* dos grupos biológicos G1, G2 e G3 (descritos no item 3.5), utilizamos a metodologia de RT-qPCR microfluídica em larga escala.

A mesma metodologia foi utilizada para a determinação do perfil transcricional de *R. rickettsii* infectando células BME26 (item 3.4). Para tal, monocamadas de BME26 foram infectadas com *R. rickettsii* utilizando-se MOI de 3,0. Após a incubação por 48 h a 34 °C, as monocamadas foram processadas conforme descrito no item 3.4. Cinco réplicas biológicas foram obtidas e utilizadas nos experimentos de RT-qPCR.

3.12.1 Oligonucleotídeos

Noventa e cinco oligonucleotídeos específicos para genes de *R. rickettsii*, selecionados com base nos resultados dos microarranjos ou envolvidos na virulência da bactéria conforme dados da literatura (Beckwith, 2013; Chan et al., 2009; Heinzen et al., 1993; Hendrick, Hartl, 1993; Li, Walker, 1998; Rahman et al., 2005; Rahman et al., 2013; Rikihisa, Lin, 2010; Uchiyama et al., 2006; Uchiyama, 2012; Walker et al., 2001; Winkler, 1976), foram desenhados utilizando-se o programa Primer3 4.0 <<http://primer3.wi.mit.edu/>> (Rozen, Skaletsky, 2000) e sintetizados pela Life Technologies (**Apêndice B**).

3.12.2 Síntese e amplificação de cDNA

Duzentos ng de RNA total de glândulas salivares ou intestinos de machos e de fêmeas de *A. aureolatum* dos três grupos biológicos (G1, G2 e G3, descritos no item 3.5) ou de células BME26 (descritas no item 3.9.2.1) foram utilizados para a confecção do cDNA com a transcriptase reversa M-MLV (Life Technologies), seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante. Previamente à síntese de cDNA, todas as amostras de RNA foram tratadas com RQ1 RNase-Free DNase (Promega) para a remoção de DNA genômico residual. Duas amostras de cDNA foram sintetizadas da mesma maneira acima descrita a partir de uma amostra *pool* de RNA de glândulas salivares e de intestinos de machos e de fêmeas de *A. aureolatum* não infectados e amostras de RNA de células BME26 não infectadas, para serem utilizadas como controle das reações. Além disso, uma amostra *pool* contendo 2 µL de cada uma das 135 amostras de cDNA foi empregada para a obtenção das curvas de eficiência (pontos gama) para cada par de oligonucleotídeos. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C até utilização nas reações de pré-amplificação.

Para a realização da pré-amplificação específica de cDNA, uma solução contendo todos os 95 pares de oligonucleotídeos (concentração final de 0,2 µM) foi preparada. Uma mistura contendo 5 µL do TaqMan PreAmp Master Mix 2X (Life Technologies) e 2,5 µL do *pool* de oligonucleotídeos foi preparada e, em seguida, adicionada a 2,5 µL de cada amostra de cDNA contidas em poços de uma placa. A placa foi centrifugada a 1000 xg por 2 min a 4 °C e transferida para um termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf), onde as reações foram realizadas com o

seguinte programa térmico: 95 °C por 10 min e 14 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 4 min. As amostras de cDNA pré-amplificadas foram diluídas em 40 µL de H₂O ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e congeladas a -20 °C até a utilização.

3.12.3 qPCR

A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada utilizando-se arranjos dinâmicos de microfluídica para qPCR (formato 96x96, Fluidigm Corporation, EUA), seguindo-se rigorosamente as especificações do fabricante (Fluidigm Corporation). Resumidamente, o óleo de controle de uma seringa de distribuição foi adicionado a cada uma das duas válvulas presentes no arranjo dinâmico. Em seguida, a placa foi posicionada em um IFC Controller HX (Fluidigm Corporation), equipamento responsável pela aplicação da pressão e distribuição dos fluidos nos microcanais controladores do arranjo. Uma mistura contendo 368 µL de TaqMan Gene Expression Master Mix 2X (Life Technologies), 36 µL de DNA Binding Dye Sample Loading Reagent 20X (Fluidigm Corporation), 36 µL de EvaGreen 20X (Biotium, EUA) e 100 µL de Tris-EDTA 1X foi preparada. Cinco µL dessa mistura foram adicionados a 1,7 µL de cada amostra de cDNA pré-amplificado. Para a obtenção de uma mistura de oligonucleotídeos, 385 µL do Assay Loading Reagent 2X (Fluidigm Corporation) foram adicionados a 193 µL de TE 1X. Da mesma maneira, 5 µL dessa mistura foram adicionados a 1,7 µL de cada par de oligonucleotídeos a ser analisado. As preparações de cDNA e de oligonucleotídeos foram distribuídas em poços presentes em cada face lateral do arranjo dinâmico.

Mais uma vez, o arranjo seguiu para o equipamento IFC Controller HX por 1h para a aplicação da pressão e distribuição das amostras e oligonucleotídeos. Em seguida, o arranjo foi transferido para o termociclador BioMark (Fluidigm Corporation) para que a realização das reações, seguindo o programa térmico descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Programa térmico das qPCR realizadas no equipamento BioMark (Fluidigm Corporation).

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Mix térmico	50	120	1
	70	1800	
	25	600	
UNG e Hot Start	50	120	1
	95	600	
Ciclo de PCR	95	15 segundos	35
	60	60 segundos	
Curva de Melting	60	3	1

3.12.4 Análise dos dados

Os dados de fluorescência gerados em cada reação foram tecnicamente normalizados com base na emissão da sonda controle (ROX), contida no 2X TaqMan® PreAmp Master Mix, (Life Technologies). Os Ct corrigidos foram extraídos pelo software Fluidigm® Real-Time PCR Analysis version 3 (Fluidigm Corporation).

A escolha dos genes de referência foi baseada nos resultados de Ct analisados pelo programa NormFinder <<http://www.mdl.dk/publications/normfinder.htm>> (Andersen et al., 2004). Uma CDS foi considerada modulada somente quando o mesmo comportamento foi observado em todas as réplicas biológicas analisadas dos experimentos *in vivo* e *in vitro*, utilizando-se um *fold-change* mínimo de ($\pm$) 1,5. Além deste parâmetro, utilizamos uma análise de variância para excluir os genes com comportamento discrepante dentro do conjunto de amostras do mesmo grupo biológico (*cut-off* de variância: < 50%).

Após a normalização inicial, os dados seguiram para o programa MeV (*MultiExperient Viewer*) <<http://www.tm4.org/mev/>>, no qual analisamos o perfil transcricional do conjunto de dados em todas as condições analisadas. O teste *t* de Student foi aplicado às medianas para avaliar se a diferença estatística entre os grupos analisados era significativa.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação do perfil de expressão gênica global de *Rickettsia rickettsii* por microarranjos de oligonucleotídeos

4.1.1 Padronização dos procedimentos para a síntese e marcação de cDNA

Para estabelecermos uma metodologia eficiente para a síntese e marcação de cDNA de *R. rickettsii* buscamos, primeiramente, um modelo *in vitro* de células de carrapato para a amplificação da bactéria e obtenção de RNA em grande quantidade. Para esse fim, um inóculo da cepa Taiacu de *R. rickettsii* em células Vero foi adicionado a uma monocamada de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BME26). Observamos que *R. rickettsii* foi capaz de infectar essa linhagem celular em todas as condições analisadas (temperatura de incubação de 28 °C e 34 °C; meio de cultura com pH 7,2) e em todas as diluições do inóculo (de 1:1 até 1:1000 com base de diluição de 10x) utilizadas (dados não mostrados). Para a visualização das células infectadas, dois métodos de coloração foram utilizados, o Panóptico (**Figuras 3A e B**) ou o Gimenez (**Figura 3C e D**). Este último mostrou-se mais eficiente para a observação de riquetsias infectando as células BME26 e foi adotado como padrão pelo nosso grupo de pesquisa. Um efeito citopático foi deflagrado pela infecção por *R. rickettsii* após 60 h em todas as condições analisadas e diluições do inóculo inicial. Um efeito citopático também é observado após 60 h de infecção de células Vero por essa cepa de *R. rickettsii* (Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna – comunicação pessoal).

Figura 3 - Observação de células BME26 infectadas com *R. rickettsii* por microscopia ótica.

Nota: As células BME26 infectadas por *R. rickettsii* foram coradas pelos métodos de Panóptico (A) ou Gimenez (C) e observadas sob microscópio Zeiss–Axiofhot (Zeiss) com aumento de 1000x. As células apresentadas correspondem ao ponto de 72 h após a inoculação de riquetsias. Como controle, células não infectadas foram coradas também com Panóptico (B) ou Gimenez (D). As riquetsias (bastonetes de coloração púrpura, setas pretas) foram visualizadas fora da célula (A) ou no interior das células infectadas (C). n: núcleo; c: citoplasma; barra preta: 10 μ m.

Após comprovar a capacidade de *R. rickettsii* de infectar células BME26, determinamos a sua curva de crescimento nessa linhagem celular, de modo a obtermos RNA de bactérias na fase logarítmica de crescimento. Para tal, um inóculo de *R. rickettsii* em células BME26 foi adicionado a novas monocamadas de células BME26 incubadas a 34 °C. O DNA genômico extraído logo após a adição do inóculo (tempo 0 h) e após 12, 24, 36, 48 e 60 h, a 34 °C e pH 7,4, foi utilizado para a quantificação do número de riquetsias por qPCR com sonda TaqMan® específica para o gene *gltA* (**Figura 4**). Observamos um aumento de uma ordem de grandeza no número de bactérias a cada 24 h. Novamente, após 60 h do início da infecção, foi observado o descolamento de um grande número de células BME26 do tapete celular (efeito citopático).

Figura 4 - Curva de crescimento de *R. rickettsii* em células BME26.

Nota: As células BME26 foram infectadas e o número de bactérias logo após a adição do inóculo (tempo 0h) e após 12, 24, 36, 48 e 72 h foi determinado por qPCR com sonda TaqMan específica para o gene *gltA* de *R. rickettsii*. Cada ponto da curva representa uma média (log₁₀) da quantidade total de *R. rickettsii* de três garrafas (triplicata biológica).

Após a determinação da curva de crescimento de *R. rickettsii*, foi possível obter uma quantidade de RNA suficiente para a padronização dos procedimentos a serem adotados na síntese e marcação de cDNA. Para esse fim, utilizamos o RNA extraído de células BME26 mantidas a 28 °C ou 34 °C por 48 h após a infecção por *R. rickettsii*. O RNA total de três garrafas (triplicata biológica) de células infectadas de cada condição analisada foi reunido formando uma amostra *pool*. A primeira variável a ser avaliada foi a necessidade da remoção do RNA eucariótico, utilizando-se para isso o kit Oligotex[®] RNAm (QIAGEN). Também avaliamos a necessidade de amplificar o cDNA após a transcrição reversa. A síntese e amplificação de cDNA foi realizada utilizando-se o kit Transplex[®] Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma-Aldrich). Por fim, comparamos a eficácia de dois kits diferentes de marcação: o Genomic DNA ULS[™] (Kreatech's Universal Linkage System) Labeling Kit (Agilent Technologies) e o FairPaly III Labeling Kit (Agilent Technologies) (vide **Figura 2** no item Material e Métodos). Ao final do processamento, cada par de amostras foi hibridizado com os microarranjos. A imagem obtida após o escaneamento (**Figura 5**)

demonstrou que a intensidade de fluorescência foi maior nas amostras submetidas à amplificação (**Figuras 5A, 5B e 5D**) do que naquelas não submetidas a esse procedimento (**Figura 5C**). Já a remoção do RNAm eucariótico pareceu não ser fundamental, uma vez que a intensidade da fluorescência obtida pelos procedimentos 1 (RNAm eucariótico removido; **Figuras 5A**) e 4 (RNAm eucariótico não removido; **Figuras 5D**) não apresentou grandes diferenças. Por fim, o procedimento 2, o único no qual as amostras foram submetidas à marcação com o Genomic DNA ULS™ Labeling Kit (**Figura 5B**), foram as que apresentaram a maior intensidade de fluorescência.

Figura 5 - Imagem gerada pelo escaneamento dos microarranjos de oligonucleotídeos após a hibridização com amostras de cDNA de *R. rickettsii* preparadas com diferentes procedimentos.

Nota: A. Amostras de cDNA preparadas com a remoção de RNAm eucariótico, com a amplificação de cDNA e com a marcação com o FairPlayIII Labeling Kit. B. Amostras de cDNA preparadas com a remoção de RNAm eucariótico, com a amplificação de cDNA e com a marcação com o Genomic DNA ULS™ Labeling Kit. C. Amostras de cDNA preparadas sem a remoção de RNAm eucariótico, sem a amplificação de cDNA e com a marcação com o FairPlayIII Labeling Kit. D. Amostras de cDNA preparadas sem a remoção de RNAm eucariótico, com a amplificação de cDNA e com a marcação com o FairPlayIII Labeling Kit.

Os parâmetros relacionados à qualidade de hibridização, estabelecidos pelo programa Feature Extraction 10.5 (Agilent Technologies), também apontaram o procedimento 2 como o mais eficiente na confecção e marcação dos cDNAs das amostras. Além da intensidade de fluorescência das amostras submetidas ou não à remoção de RNAm eucariótico ter sido similar, a recuperação de RNA com o kit Oligotex[®] mRNA (QIAGEN) apresentou grandes variações entre amostras. Dessa forma, para as análises subsequentes, o RNA total extraído de células BME26 ou de carrapatos infectados por *R. rickettsii* não foi submetido à remoção do RNA eucariótico, mas foram submetidas ao procedimento de amplificação. Além disso, utilizamos o Genomic DNA ULS[™] Labeling Kit para a marcação com os fluoróforos.

4.2 Efeitos de estímulos ambientais sobre o perfil transcricional de *R. rickettsii* infectando carrapatos *Amblyomma aureolatum*

4.2.1 Infecção experimental de carrapatos

Conforme descrito no item Material e Métodos, cobaias foram inoculadas com um homogeneizado de baço e fígado de uma cobaia sacrificada previamente durante o pico febril da infecção por *R. rickettsii*. As larvas de *A. aureolatum* foram depositadas em câmaras de alimentação afixadas ao dorso de cobaias para que realizassem o repasto sanguíneo. Após a ecdise, as ninfas foram alimentadas da mesma forma descrita para as larvas, porém em coelhos. Por fim, após a ecdise para a fase adulta, os adultos foram subdivididos em três grupos. Os integrantes dos grupos denominados G1 e G2 não foram alimentados, tendo sido mantidos em incubadoras BOD com temperaturas ajustadas para 25 °C e 35 °C, respectivamente, por três dias. Os integrantes do terceiro subgrupo, denominado G3, foram alimentados por três dias em cães. Ao final das etapas de incubação ou alimentação, os órgãos totais ou as glândulas salivares e os intestinos dos carrapatos dos três grupos foram dissecados e submetidos individualmente à extração simultânea de RNA total e DNA genômico (DNAg). O DNAg foi utilizado para a determinação do número total de bactérias nos tecidos por qPCR com sonda TaqMan[®] específica para o gene *gltA* de *R. rickettsii*.

Os resultados das qPCR nos mostraram que 100% dos carrapatos estavam infectados por *R. rickettsii*. Além disso, observamos que o grupo de carrapatos

alimentados (G3 – $7,2 \pm 4,0 \times 10^8$) apresentou uma parcela de fêmeas (**Figura 6A**) e de machos (**Figura 6B**) com, em média, três vezes mais bactérias que os indivíduos dos grupos não alimentados e mantidos a 25 °C (G1 – $2,2 \pm 2,0 \times 10^8$) ou a 35 °C (G2 – $3,4 \pm 2,2 \times 10^8$). Os carrapatos do G2 também apresentaram um número significativamente maior de bactérias em relação aos do G1. Esses resultados demonstraram que tanto a elevação da temperatura quanto a aquisição da alimentação sanguínea aumentam significativamente a capacidade de proliferação da bactéria no carrapato-vetor.

Figura 6. Níveis de infecção em órgãos de carrapatos *A. aureolatum* adultos.

Nota: Para a quantificação dos níveis de infecção, o DNAg isolado dos órgãos de fêmeas (A) e de machos (B) dos 3 grupos G1 e G2 (não alimentados e incubados a 25 °C e 35 °C, respectivamente) e G3 (alimentados) foram analisados individualmente por qPCR com sonda TaqMan específica para o gene *gltA* de *Rickettsia*. As medianas estão representadas pelas linhas horizontais centrais de cada caixa. * $p < 0.001$ (test *t* de Student).

4.2.2 Efeitos da temperatura sobre o perfil de expressão gênica global de *R. rickettsii*

Primeiramente, duas amostras *pool* de RNA do G1 (fêmeas não alimentadas incubadas a 25 °C por 3 dias) e do G2 (fêmeas não alimentadas incubadas a 35 °C por 3 dias) foram obtidas. Cada amostra foi constituída pelo RNA extraído dos órgãos de sete fêmeas apresentando entre $1,60 \times 10^8$ e $2,20 \times 10^8$ bactérias. Após a síntese, amplificação e marcação do aRNA, as amostras foram hibridizadas com os microarranjos. Como controle, amostras de aRNA produzidas a partir do RNA de carrapatos não infectados também foram hibridizadas com os microarranjos. Os

dados normalizados de fluorescência foram utilizados para a identificação das sequências codificadoras (CDS) de *R. rickettsii* moduladas pelo aumento da temperatura.

Das 1.304 CDS de *R. rickettsii* representadas no microarranjo, 44 (3,37%) foram moduladas pela elevação da temperatura de 25 °C para 35 °C, sendo que 25 foram induzidas e 19 foram reprimidas. Catorze (31,81%) são CDS que codificam proteínas com função anotada (**Tabela 2**) e 30 (68,18%) codificam proteínas hipotéticas (**Apêndice C**). As CDS representadas pelos oligonucleotídeos que tiveram hibridização cruzada com o aRNA de carrapatos não infectados (5,7%) foram excluídas das análises.

A elevação da temperatura em 10 °C induziu a transcrição de CDS de enzimas ligadas ao processamento de RNA (dimetiladenosina transferase e endonuclease ligante de DNA/metalo proteína/AP putativa), além da CDS da recombinase XerD tirosina sítio específico. Importaneamente, duas proteínas ligadas a adaptações do microrganismo a alterações de temperatura (proteína de choque frio e GrpE) foram induzidas. Por outro lado, CDS de enzimas relacionadas ao metabolismo energético (succinato semialdeído desidrogenase), ao metabolismo de lipídeos (subunidade B da coenzima transferase succinil-CoA:3-cetoácido A), além de proteínas associadas com a formação ou reparo de DNA (subunidade A da DNA girase, subunidade alfa da ribonucleotídeo-difosfato redutase e proteína de reparo e emparelhamento de DNA) foram reprimidas (**Figura 7**).

Figura 7 - Classificação funcional das CDS de *R. rickettsii* moduladas pelo aumento da temperatura de incubação de 25 °C para 35 °C durante a infecção de fêmeas de *A. aureolatum*.

* Sinal: abreviação de sinalização.

Tabela 2 – CDS de *R. rickettsii* com função anotada moduladas pela elevação da temperatura de incubação do carrapato vetor de 25 °C para 35 °C.

Identificação do gene	CDS	Anotação	COG	Fold-change	
				Réplica biológica 1	Réplica biológica 2
A1G_00390	ref NC_009882.1_:c57026-55992	Endonuclease putativa ligante de DNA/metaloproteína/AP	COG0533O	1,98	1,72
A1G_00800	ref NC_009882.1_:132498-133136	Proteína YsxC ligante de GTP	COG0218R	1,87	1,61
A1G_02195	ref NC_009882.1_:c388225-387110	Subunidade D putativa do antiporter de cátion/H ⁺ monovalente	COG0651CP	1,68	1,57
A1G_02785	ref NC_009882.1_:487702-488622	Recombinase XerD tirosina sítio-específica	COG4974L	1,53	1,53
A1G_05185	ref NC_009882.1_:c874676-873717	Proteína CorA de transporte de magnésio e cobalto	COG0598P	1,66	1,52
A1G_05370	ref NC_009882.1_:909316-909915	Proteína GrpE	COG0576O	1,62	1,80
A1G_05630	ref NC_009882.1_:c944176-943964	Proteína de choque frio- <i>like</i>	COG1278K	1,98	1,87
A1G_05635	ref NC_009882.1_:c946479-945574	Dimetiladenosina transferase	COG0030J	1,82	1,50
A1G_05960	ref NC_009882.1_:991314-992378	Proteína de resistência a biciclomicina	COG2814G	1,60	1,53
A1G_03490	ref NC_009882.1_:608404-609831	Succinato semialdeído desidrogenase	COG1012C	-1,79	-1,59
A1G_03670	ref NC_009882.1_:632043-633866	Subunidade alfa da ribonucleotídeo-difosfato redutase	COG0209F	-1,78	-1,89
A1G_03790	ref NC_009882.1_:652833-655895	Antígeno de superfície	-	-1,99	-1,60
A1G_05000	ref NC_009882.1_:844068-844703	Subunidade B da coenzima transferase succinil-CoA:3-cetoácido A	COG2057I	-2,32	-1,95
A1G_07470	ref NC_009882.1_:c1249026-1247194	Proteína de reparo e emparelhamento de DNA	COG0323L	-1,69	-1,54

4.2.3 Determinação dos efeitos da alimentação sobre o perfil de expressão gênica global de *R. rickettsii*

Duas amostras *pool* de RNA dos grupos G2 (fêmeas não alimentadas incubadas a 35 °C por 3 dias) e G3 (fêmeas alimentadas em cães por 3 dias) foram obtidas. Cada amostra foi constituída pelo RNA extraído dos órgãos de sete fêmeas apresentando entre $1,60 \times 10^8$ e $2,20 \times 10^8$ bactérias. Após a síntese e marcação do aRNA, as amostras foram hibridizadas com os microarranjos. Identificamos 221 CDS moduladas, as quais correspondem a cerca de 16% do total de CDS de *R. rickettsii* representadas nos microarranjos. Destas, 80 (36,20%) foram induzidas e 141 (63,80%) foram reprimidas, sendo que 119 (53,12%) codificam proteínas com função anotada (**Tabelas 3 e 4**) e 105 (46,87%) codificam proteínas hipotéticas (**Apêndice D e E**). Conforme descrito para a identificação de CDS de *R. rickettsii* moduladas pela elevação da temperatura, as CDS representadas pelos oligonucleotídeos que tiveram hibridização cruzada com o aRNA de carrapatos não infectados também foram excluídas das análises.

A aquisição da alimentação sanguínea pelo vetor induziu a transcrição de seis CDS ligadas à geração de energia (por exemplo, as subunidades G e C da proteína putativa de *antiporter* de cátion/ H^+ monovalente e as subunidade A e B da ATP sintase F0F1) (**Figura 8**). Ainda, CDS de enzimas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons, tais como a subunidade G da NADH desidrogenase e polipeptídeos I e II da citocromo c oxidase, além da subunidade β da NAD(P) transidrogenase também foram induzidas pela alimentação sanguínea. Ademais, CDS de proteínas envolvidas nas funções de síntese e reparo de DNA também foram induzidas nesta condição, como mostrado pelo aumento de transcrição da subunidade alfa da DNA polimerase II, das exodesoxirribonucleases III e VII e das proteínas de reparo MutS, RecO e RecJ. Os eventos de tradução também se destacam nesta condição, já que ocorreu a indução das CDS da proteína ribossomal S8 da subunidade 30S das proteínas L18 e L28 da subunidade 50S e do fator de iniciação da tradução (IF-3). Também se destaca a indução de CDS de proteínas relacionadas ao provável estresse oxidativo sofrido pela bactéria nos carrapatos alimentados, tais como a ferredoxina, a glutarredoxina 3 e a tiorredoxina peroxidase 1. Importaneamente, a expressão de alguns fatores de virulência bacterianos também foi induzida pela alimentação sanguínea, dentre eles seis componentes do

sistema de secreção do tipo IV (VirD4, VirB4, VirB8, VirB9, VirB10 e VirB11). O componente VirB3, por outro lado, foi reprimido pela aquisição de sangue.

Figura 8 - Classificação funcional das CDS de *R. rickettsii* moduladas pela alimentação sanguínea de fêmeas de *A. aureolatum* infectadas.

*Armazenar e processar informação: abreviação de armazenamento e processamento de informação.

Tabela 3 – CDS de *R. rickettsii* com função anotada induzidas pela alimentação sanguínea do carrapato.

Identificação do gene	CDS	Anotação	COG	Fold-change	
				Réplica biológica 1	Réplica biológica 2
A1G_00160	ref NC_009882.1 c29202-28708	Subunidade B da ATP sintase FOF1	COG0711C	1,70	1,94
A1G_00175	ref NC_009882.1 c30842-30114	Subunidade A da ATP sintase FOF1	COG0356C	2,30	2,39
A1G_00430	ref NC_009882.1 c64387-64584	Metilase de DNA sítio-específica	COG0270L	1,78	2,08
A1G_00635	ref NC_009882.1 c102248-100851	Subunidade beta da NAD(p) transidrogenase	COG1282C	1,89	1,80
A1G_00785	ref NC_009882.1 c131143-131006	Proteína L28 ribossomal (50S)	-	1,77	1,77
A1G_01205	ref NC_009882.1 c225568-225900	Proteína HU ligante de DNA	COG0776L	3,09	3,48
A1G_01215	ref NC_009882.1 c227060-228409	Proteína de reconhecimento de partículas	COG0541U	1,64	1,62
A1G_01495	ref NC_009882.1 c269892-269554	Ferredoxina	COG0633C	2,30	2,09
A1G_01525	ref NC_009882.1 c275087-275395	Glutarredoxina 3	COG0695O	3,12	2,23
A1G_02025	ref NC_009882.1 c360525-360845	Subunidade G do antiporter putativo de cation/H ⁺ monovalente	COG1320P	2,04	1,66
A1G_02035	ref NC_009882.1 c361975-362622	Proteína B de transporte de heme	-	1,53	1,76
A1G_02200	ref NC_009882.1 c388743-388408	Subunidade C do antiporter putativo de cation/H ⁺ monovalente	COG1006P	2,00	2,14
A1G_02205	ref NC_009882.1 c389574-388822	Proteína VirB9	COG3504U	2,42	2,35
A1G_02210	ref NC_009882.1 c390274-389576	Proteína VirB8	COG3736U	2,23	1,93
A1G_02230	ref NC_009882.1 c392342-393790	Proteína VirB10	COG2948U	1,69	1,76
A1G_02235	ref NC_009882.1 c393787-394791	ATPase VirB11 do Sistema de secreção do tipo IV	COG0630NU	1,70	1,66
A1G_02240	ref NC_009882.1 c394925-396700	Componente VirD4 do Sistema de secreção do tipo IV	COG3505U	1,72	1,94
A1G_02290	ref NC_009882.1 c406315-403655	Proteína MutS de reparo e emparelhamento de DNA	COG0249L	1,70	1,76
A1G_02555	ref NC_009882.1 c450224-449622	Tiorredoxina peroxidase 1	COG0450O	1,59	1,75
A1G_02595	ref NC_009882.1 c455319-456344	Proteína capD	COG1086MG	1,54	1,63
A1G_02600	ref NC_009882.1 c456337-457470	Epimerase UDP-N-acetilglucosamina 2 putativa	COG0381M	1,65	1,77
A1G_02690	ref NC_009882.1 c477545-477787	Subunidade menor da exodesoxirribonuclease VII	COG1722L	1,64	2,91
A1G_03140	ref NC_009882.1 c552178-551231	Polipeptídeo II da Citocromo C oxidase	COG1622C	1,54	1,58
A1G_03350	ref NC_009882.1 c587602-588060	Proteína ligante SsrA	COG0691O	2,12	2,06
A1G_03685	ref NC_009882.1 c634696-635682	Subunidade beta da redutase ribonucleotídeo-difosfato	COG0208F	1,61	1,71
A1G_03930	ref NC_009882.1 c676576-677049	Fator de iniciação da tradução IF-3	COG0290J	1,84	1,86
A1G_03935	ref NC_009882.1 c677195-678433	Subunidade E2 da desidrogenase de alfa-cetoácido de cadeia ramificada	COG0508C	1,52	1,54
A1G_03945	ref NC_009882.1 c679794-681557	Exonuclease RecJ específica de fita única de DNA	COG0608L	1,50	1,76
A1G_04575	ref NC_009882.1 c772880-773593	Proteína de reparo de DNA RecO	COG1381L	1,65	2,16
A1G_05475	ref NC_009882.1 c923789-923442	Proteína L18 ribossomal (50S)	COG0256J	1,77	2,39
A1G_05485	ref NC_009882.1 c924745-924347	Proteína S8 ribossomal (30S)	COG0096J	1,66	1,94
A1G_05670	ref NC_009882.1 c952076-952858	Exodesoxirribonuclease III	COG0708L	1,59	1,76
A1G_06385	ref NC_009882.1 c1054896-1055495	Fosfatidilglicerofosfatase A	COG1267I	2,16	1,75
A1G_06495	ref NC_009882.1 c1074289-1075014	Proteína carreadora de acil (3-cetoacil redutase)	COG1028IQR	1,57	1,54
A1G_06605	ref NC_009882.1 c1093598-1093933	Sintetase S-adenosilmetionina	COG0192H	2,01	2,13
A1G_06640	ref NC_009882.1 c1099203-1095658	Subunidade alfa da DNA polimerase III	COG0587L	1,73	1,73
A1G_06655	ref NC_009882.1 c1103534-1105075	Proteína AmpG	-	1,60	1,63
A1G_06670	ref NC_009882.1 c1107497-1109929	Proteína precursora VirB4	COG3451U	2,10	2,08
A1G_06740	ref NC_009882.1 c1127546-1125516	Subunidade G da NADH desidrogenase	COG1034C	1,67	1,66
A1G_06750	ref NC_009882.1 c1130695-1128059	Aconitase hidratase	COG1048C	2,21	1,97

Tabela 4 – CDS de *R. rickettsii* com função anotada reprimidas pela alimentação sanguínea do carrapato.

Identificação do gene	CDS	Anotação	COG	Fold-change	
				Réplica biológica 1	Réplica biológica 2
A1G_00015	ref NC_009882.1 :1409-2158	Proteína ligante de ATP RfbE do sistema de exportação do antígeno O	COG1134GM	-1,76	-1,63
A1G_00025	ref NC_009882.1 :2932-6033	Hidroxilase putativa bifuncional glutamato sintase, subunidade beta/2-poliprenilfenol	COG0493ER	-1,60	-1,54
A1G_00080	ref NC_009882.1 :12813-13808	Proteína NifR3- <i>like</i>	COG0042J	-1,66	-1,71
A1G_00200	ref NC_009882.1 :34713-34922	Fator de recombinação F	-	-1,55	-1,64
A1G_00295	ref NC_009882.1 :45976-46317	Antígeno- <i>like</i> de superfície Sca10	-	-2,39	-2,27
A1G_00390	ref NC_009882.1 :c57026-55992	Endonuclease putativa ligante de DNA /ferro metaloproteína/AP	COG0533O	-2,45	-2,22
A1G_00395	ref NC_009882.1 :c58403-57210	Acil-CoA dessaturase 1	COG1398I	-2,13	-1,64
A1G_00515	ref NC_009882.1 :75811-77307	Proteína carreadora de ADP,ATP	COG3202C	-2,20	-2,41
A1G_00520	ref NC_009882.1 :77503-78798	Transportador de glicerol-3-fosfato	COG2271G	-1,62	-1,83
A1G_00525	ref NC_009882.1 :78823-79245	Nucleosídeo difosfato quinase	COG0105F	-1,69	-1,81
A1G_00530	ref NC_009882.1 :79249-81117	Enzima de modificação GidA tRNA uridine 5-carboximetilaminometil	COG0445D	-2,04	-1,81
A1G_00575	ref NC_009882.1 :c88344-88012	Proteína acessória de associação ferro-enxofre	COG0316S	-2,58	-2,68
A1G_00680	ref NC_009882.1 :114829-115716	Proteína S2 ribossomal (30S)	COG0052J	-2,62	-2,29
A1G_00685	ref NC_009882.1 :115915-116844	Fator de elongação Ts	COG0264J	-1,79	-1,78
A1G_00800	ref NC_009882.1 :132498-133136	Proteína YsxC ligante de GTP de biogênese de ribossomo	COG0218R	-3,11	-2,61
A1G_00805	ref NC_009882.1 :133207-134007	Acetilglutamato quinase	COG0548E	-2,32	-1,75
A1G_00810	ref NC_009882.1 :134020-134307	Proteína VirB3 do sistema de secreção tipo IV	COG3702U	-2,07	-1,89
A1G_00880	ref NC_009882.1 :155386-155802	Proteína L19 ribossomal (50S)	COG0335J	-2,44	-1,88
A1G_00920	ref NC_009882.1 :161909-162601	tRNA/rRNA metiltransferase	COG0565J	-1,95	-1,79
A1G_00945	ref NC_009882.1 :165322-166362	Modulador da atividade de protease HflK	COG0330O	-1,58	-1,60
A1G_01390	ref NC_009882.1 :256639-257463	2,3,4,5-tetraidropiridina-2,6-carboxilato N-succiniltransferase	COG2171E	-1,71	-1,56
A1G_01440	ref NC_009882.1 :266435-266578	Antígeno- <i>like</i> de superfície Sca8	-	-5,66	-5,15
A1G_01445	ref NC_009882.1 :262509-262940	Antígeno- <i>like</i> de superfície Sca8	-	-4,06	-3,50
A1G_01475	ref NC_009882.1 :263261-263530	Antígeno- <i>like</i> de superfície Sca8	-	-6,15	-7,11
A1G_01595	ref NC_009882.1 :283754-284281	Peptídeo deformilase	COG0242J	-2,32	-1,94
A1G_01600	ref NC_009882.1 :284293-285189	Formiltransferase metionil-tRNA	COG0223J	-1,93	-2,00
A1G_01640	ref NC_009882.1 :c295786-294017	Ligante de ATP do transportador ABC resistente a multidrogas	COG1132V	-1,64	-1,65
A1G_01670	ref NC_009882.1 :299495-300343	Beta 1,4-glicosiltransferase	COG0463M	-3,08	-2,15
A1G_01675	ref NC_009882.1 :300420-301658	Protease mitocondrial	COG0612R	-2,34	-1,83
A1G_01680	ref NC_009882.1 :301812-302522	Fosforribosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintetase	COG0152F	-1,93	-1,62
A1G_01995	ref NC_009882.1 :c357123-355294	Proteína ligante de GTP	COG1217T	-2,23	-2,16
A1G_02095	ref NC_009882.1 :c370213-369356	Fator 2 de relaxamento de cadeia peptídica	COG1186J	-1,57	-1,76
A1G_02170	ref NC_009882.1 :c384629-383091	Subunidade D putativa de antiporter de cation/H ⁺ monovalente	COG0651CP	-1,63	-2,04
A1G_02680	ref NC_009882.1 :c474839-474342	Proteína RimM de processamento de rRNA16S	COG0806J	-2,18	-1,93
A1G_02785	ref NC_009882.1 :487702-488622	Recombinase XerD tirosina sítio-específica	COG4974L	-2,52	-2,87
A1G_02825	ref NC_009882.1 :496734-497573	Permease de transportador ABC	COG4120R	-1,84	-1,95
A1G_02830	ref NC_009882.1 :497570-498292	Ligante putativo de ATP do transportador ABC	COG1101R	-1,79	-2,34
A1G_03010	ref NC_009882.1 :525371-525985	DNA helicase RuvA - <i>Holliday junction</i>	COG0632L	-3,83	-3,52
A1G_03025	ref NC_009882.1 :526978-528006	DNA helicase RuvB - <i>Holliday junction</i>	COG2255L	-1,53	-1,63
A1G_03150	ref NC_009882.1 :554615-555154	Peptidase sinal de lipoproteína	COG0597MU	-2,65	-2,19

Tabela 4 (Continuação).

Identificação do gene	CDS	Anotação	COG	Fold-change	
				Réplica biológica 1	Réplica biológica 2
A1G_03160	ref NC_009882.1 :555741-557243	UDP-N-acetilmuramoi-L-alanil-D-glutamato sintetase	COG0771M	-1,88	-1,66
A1G_03165	ref NC_009882.1 :557375-558508	Proteína de divisão celular FtsW	COG0772D	-2,31	-2,00
A1G_03170	ref NC_009882.1 :558505-559635	Undecaprenildifosfo-muramoi-pentapeptideo beta-N- acetilglucosaminiltransferase	COG0707M	-1,65	-1,54
A1G_03250	ref NC_009882.1 :568298-567279	Proteína CapM	COG0438M	-3,43	-2,99
A1G_03280	ref NC_009882.1 :571571-572620	Subunidade alfa da fenilalanil-tRNA sintetase	COG0016J	-1,52	-1,50
A1G_03780	ref NC_009882.1 :651005-652540	tRNA pseudouridina sintase B	COG0130J	-1,90	-1,96
A1G_04070	ref NC_009882.1 :698126-696873	Proteína ampG	COG2271G	-2,05	-1,66
A1G_04075	ref NC_009882.1 :698615-698370	Transposase	-	-2,44	-2,34
A1G_04275	ref NC_009882.1 :729262-728207	Porfobilinogênio desaminase	COG0181H	-4,57	-6,30
A1G_04285	ref NC_009882.1 :730629-730501	Histidina quinase de simporte de Na+/prolina e tradução de sinais	-	-6,29	-5,12
A1G_04290	ref NC_009882.1 :731081-730683	Histidina quinase sensor de 2-componentes	COG2205T	-6,91	-5,17
A1G_04835	ref NC_009882.1 :813871-813740	Subunidade R (restriction) do tipo 1 sítio- específica do sistema de modificação e restrição	-	-2,28	-1,84
A1G_05020	ref NC_009882.1 :845765-845917	Fosfo-N-acetilmuramoi-pentapeptideo-transferase	-	-2,09	-2,68
A1G_05095	ref NC_009882.1 :991314-992378	Proteína de resistência a biciclomicina	-	-4,62	-3,16
A1G_05210	ref NC_009882.1 :881085-879286	Proteína reguladora de nitrogênio NtrY	COG5000T	-2,10	-2,52
A1G_05315	ref NC_009882.1 :901984-901727	Chaperonina GroEL	-	-1,53	-1,88
A1G_05620	ref NC_009882.1 :941865-940801	Proteína ampG	-	-2,43	-1,96
A1G_05625	ref NC_009882.1 :943449-942217	RNA helicase RhlE ATP-dependente	COG0513LKJ	-2,98	-2,49
A1G_05635	ref NC_009882.1 :946479-945574	Dimetiladenosina transferase	COG0030J	-3,61	-2,68
A1G_05925	ref NC_009882.1 :985898-984621	Subunidade ClpX ligante de ATP da protease ATP-dependente	COG1219O	-1,87	-1,62
A1G_05935	ref NC_009882.1 :987336-986650	Proteína trans-regulatória ExsB	COG0603R	-2,76	-3,02
A1G_05960	ref NC_009882.1 :862507-862325	Proteína de resistência a biciclomicina	COG2814G	-1,87	-1,58
A1G_06065	ref NC_009882.1 :1013060-1012188	Lauril aciltransferase lipídeo A	COG1560M	-2,51	-2,19
A1G_06070	ref NC_009882.1 :1014000-1013035	Tetraacildissacarídeo 4'-quinase	COG1663M	-3,18	-2,98
A1G_06075	ref NC_009882.1 :1014858-1014004	Proteína periplasmática putativa	COG0739M	-3,36	-4,04
A1G_06135	ref NC_009882.1 :1024825-1024376	Proteína ligante de substrato de transportador ABC	COG1463Q	-1,70	-1,56
A1G_06145	ref NC_009882.1 :1025600-1025133	Ribonuclease H	COG0328L	-2,08	-1,82
A1G_06170	ref NC_009882.1 :1029038-1029760	Proteína surfet, locus 1	COG3346S	-2,18	-2,05
A1G_06265	ref NC_009882.1 :1040765-1042162	Proteína carreadora de ADP,ATP	COG3202C	-1,91	-2,02
A1G_06400	ref NC_009882.1 :1056470-1057675	Aspartato quinase	COG0527E	-1,87	-1,77
A1G_06435	ref NC_009882.1 :1061573-1060332	Transportador prolina/betaina	-	-3,11	-2,65
A1G_06705	ref NC_009882.1 :1117766-1118383	NADH desidrogenase subunidade J	COG0839C	-2,11	-1,93
A1G_06710	ref NC_009882.1 :1118376-1118690	NADH desidrogenase subunidade K	COG0713C	-4,59	-3,56
A1G_06715	ref NC_009882.1 :1118690-1120663	NADH desidrogenase subunidade L	COG1009CP	-1,97	-1,54
A1G_07355	ref NC_009882.1 :1234383-1234144	Antitoxina do sistema de toxina-antitoxina StbD	COG2161D	-3,32	-2,82
A1G_07375	ref NC_009882.1 :1236834-1237097	Proteína J induzida por danos ao DNA	COG3077L	-1,98	-1,82
A1G_07380	ref NC_009882.1 :1237189-1237332	Toxina do sistema de toxina-antitoxina da família de proteínas RelE/StbE	COG3041S	-3,13	-2,62
A1G_07400	ref NC_009882.1 :1240365-1239220	Succinil-diaminopimelato desuccinilase	COG0624E	-2,61	-2,18

4.3 Caracterização *in silico* das proteínas hipotéticas moduladas pela temperatura e alimentação sanguínea

Dentre as CDS de *R. rickettsii* moduladas pela elevação da temperatura e pela alimentação sanguínea em carrapatos, identificadas pelos experimentos de microarranjos, 133 (56%) codificam proteínas hipotéticas. Interessantemente, muitas CDS de proteínas hipotéticas apresentaram valores de *fold-change* bastante superiores aos de CDS de proteínas com função anotada. A fim de obtermos mais informações acerca dessas CDS, realizamos uma análise *in silico* de similaridade com domínios característicos de proteínas eucarióticas e procarióticas presentes no banco de dados público *Conserved Domain Database* (CDD). Das CDS analisadas que foram moduladas pela elevação da temperatura, 17 apresentaram similaridade com proteínas previamente anotadas (*e-values* entre 2.99e-03 e 2.16e-50) (**Tabela 5**). Treze CDS diferencialmente expressas pela temperatura não exibiram nenhuma similaridade com proteínas dos bancos de dados. Das 103 CDS de proteínas hipotéticas moduladas pela alimentação sanguínea, 72 apresentaram similaridades com proteínas do banco de dados (*e-values* entre 2.90e-03 e 3.00e-116) (**Tabelas 6 e 7**) e 31 CDS não exibiram nenhuma identidade com estruturas previamente descritas.

Tabela 5 – Análise de similaridade de proteínas hipotéticas moduladas pelo aumento de temperatura de incubação de 25 °C para 35 °C.

CDS	Anotação	Média do <i>fold-change</i> (réplicas biológicas 1; 2)	Busca de domínios - CDD	E-Value
Reprimidas pela elevação de temperatura				
ref NC_009882.1_:489832-490995	Proteína hipotética A1G_02795	1,99 (2,07; 1,92)	Lipoproteína_7[pfam01540] - Lipoproteína adesina	2.65e-03
ref NC_009882.1_:520257-521780	Proteína hipotética A1G_02985	2,25 (2,50; 1,99)	Heme_Cu_Oxidase_I super família[cl00275] - Subunidade I da heme-cobre oxidase	6.66e-18
ref NC_009882.1_:691150-691590	Proteína hipotética A1G_04030	2,07 (2,31; 1,84)	COG5622[COG5622] - Proteína requerida para ligação à células do hospedeiro	4.84e-61
ref NC_009882.1_:c871627-869777	Proteína hipotética A1G_05165	2,92 (2,90; 2,95)	ANK[cd00204] - repetições de ankirina	4.60e-03
ref NC_009882.1_:1020437-1020736	Proteína hipotética A1G_06100	2,26 (2,96; 1,56)	SpoT[COG0317] - Pirofosfohidrolase/sintetase guanosina pilofosfato	2.71e-16
ref NC_009882.1_:1250262-1250714	Proteína hipotética A1G_07480	2,62 (3,02; 2,21)	SNF2_assoc super família [cl07173] - Helicase SNF2 bacteriana	9.57e-03
Induzidas pela elevação de temperatura				
ref NC_009882.1_:c346202-345054	Proteína hipotética A1G_01945	2,19 (2,26; 2,12)	Super família AgrB [cl01873] - Gene acessório regulador B	8.85e-04
ref NC_009882.1_:524000-524968	Proteína hipotética A1G_03000	2,92 (3,46; 2,38)	Família Fic/DOC de filamentação induzida por cAMP	2.07e-22
ref NC_009882.1_:c535744-534896	Proteína hipotética A1G_03065	1,80 (1,99; 1,61)	FTR1[pfam03239] - Família FTR1 da ferro permease	9.12e-60
ref NC_009882.1_:787589-787804	Proteína hipotética A1G_04655	1,89 (1,84; 1,94)	Transposase_20[pfam02371] - Família IS116/IS110/IS902 de transposase	6.69e-08
ref NC_009882.1_:c947519-946632	Proteína hipotética A1G_05640	2,04 (2,23; 1,85)	SurA_N_3 super família [cl07813] - Domínio N-terminal da chaperona SurA	2.06e-12
ref NC_009882.1_:c1226140-1225526	Proteína hipotética A1G_07280	1,70 (1,72; 1,69)	MFS[cd06174] - Principal facilitador da superfamília de transporters secundários	8.65e-04

Tabela 6 – Análise de similaridade de proteínas hipotéticas induzidas pela alimentação sanguínea.

CDS	Anotação	Média do fold change (réplicas biológicas 1; 2)	Busca de domínios - CDD	E-Value
Induzidas pela alimentação sanguínea				
ref NC_009882.1_c32054-31221	Proteína hipotética A1G_00185	2,02 (2,13; 1,92)	pfam13462 - Tiorredoxina	9.74e-56
ref NC_009882.1_c43779-43210	Proteína hipotética A1G_00270	1,70 (1,54; 1,85)	COG1678 - Fator transcricional putativo	2.36e-80
ref NC_009882.1_c58861-58682	Proteína hipotética A1G_00400	1,87 (1,84; 1,90)	Super família HTH [cl00088] - Domínio Helix-turn-helix	5.69e-09
ref NC_009882.1_c96803-95487	Proteína hipotética A1G_00605	2,69 (2,76; 2,62)	Porina_4[pfam13609], Porina Gram negativa	3.11e-17
ref NC_009882.1_c103121-102387	Proteína hipotética A1G_00640	1,83 (1,84; 1,81)	OmpW[COG3047], Proteína W da membrana externa	1.89e-48
ref NC_009882.1_c122272-122108	Proteína hipotética A1G_00715	2,09 (1,88; 2,30)	PhdYefM_antitox[pfam02604], Antitoxina Phd_YefM do sistema tipo II da toxina antitoxina	1.12e-14
ref NC_009882.1_c122409-123413	Proteína hipotética A1G_00720	1,80 (1,53; 2,07)	TPR[cd00189] - Domínio do repeat tetratricopeptídeo	1.58e-06
ref NC_009882.1_c191555-190416	Proteína hipotética A1G_01045	1,99 (1,83; 2,15)	RPE1[TIGR01045] - Elemento palindrômico de Rickettsia - domínio RPE1	1.61e-18
ref NC_009882.1_c245095-244994	Proteína hipotética A1G_01325	1,99 (1,99; 1,99)	ChaB super família [cl01887] -ChaB	4.71e-12
ref NC_009882.1_c255227-255586	Proteína hipotética A1G_01380	2,71 (2,69; 2,73)	VirB2[COG3838] - Componente VirB2 do Sistema de secreção tipo IV	2.17e-21
ref NC_009882.1_c268466-267525	Proteína hipotética A1G_01485	1,61 (1,56; 1,66)	Imp[COG2358] - Componente periplasmático TRAP-type não caracterizado de sistema de transporte	1.77e-111
ref NC_009882.1_c269541-268471	Proteína hipotética A1G_01490	2,14 (2,16; 2,12)	MopB_Res-Cmplx1_Nad11-M [cd02774] - NADH Oxiredutase mitocondrial codificada	9.49e-05
ref NC_009882.1_c283121-283303	Proteína hipotética A1G_01585	1,87 (1,83; 1,91)	HIG_1_N[pfam04588] - Região conservada da proteína induzida por hipóxia	2.52e-06
ref NC_009882.1_c436964-437104	Proteína hipotética A1G_02475	1,61 (1,50; 1,72)	PDDEXK_2 super família [cl15088] - Transposase PD-(D/E)XK	8.12e-06
ref NC_009882.1_c551038-550655	Proteína hipotética A1G_03135	1,70 (1,68; 1,72)	LbH_XAT[cd03349] - Aciltransferase xenobiotico	1.25e-09
ref NC_009882.1_c609991-610131	Proteína hipotética A1G_03495	2,31 (1,91; 2,71)	COG3956[COG3956] - Proteína com domínio tetrapirrolmetiltransferase	4.87e-03
ref NC_009882.1_c782754-783182	Proteína hipotética A1G_04620	1,91 (2,12; 1,70)	Super família HTH [cl00088] - Domínio Helix-turn-helix	4.82e-39
ref NC_009882.1_c790607-790365	Proteína hipotética A1G_04690	1,94 (1,88; 2,01)	Super família Flu_M2 [cl02903] - Proteína de matriz de Influenza (M2)	2.90e-03
ref NC_009882.1_c913327-913094	Proteína hipotética A1G_05400	2,13 (1,90; 2,36)	GAS[pfam13851] - Ligante específico de microtúbulo	4.10e-03
ref NC_009882.1_c994684-996585	Proteína hipotética A1G_05975	1,78 (1,61; 1,95)	ULP1[COG5160] - Protease - família Ulp1	4.27e-04
ref NC_009882.1_c1051294-1051470	Proteína hipotética A1G_06350	3,57 (4,12; 3,01)	COG5510[COG5510] - Pequena proteína secretada	4.88e-15
ref NC_009882.1_c1062928-1062575	Proteína hipotética A1G_06455	1,83 (2,06; 1,61)	HTH_25[pfam13413] - Domínio Helix-turn-helix	1.10e-20
ref NC_009882.1_c1071820-1071686	Proteína hipotética A1G_06480	1,98 (1,88; 2,08)	PRK14995[PRK14995] - Proteína metil SmvA viologen de resistência	4.84e-04
ref NC_009882.1_c1100886-1103396	Proteína hipotética A1G_06650	1,90 (1,75; 2,04)	AsmA_2[pfam13502] - região C-terminal AsmA-like	2.31e-07
ref NC_009882.1_c1127890-1127534	Proteína hipotética A1G_06745	2,82 (2,94; 2,69)	COG3671[COG3671] - Proteína predita de membrana	3.91e-67
ref NC_009882.1_c1233873-1233787	Proteína hipotética A1G_07345	2,03 (1,96; 2,10)	Super família transpeptidase [cl01009] - Domínio transpeptidase da proteína ligante de penicilina	1.05e-05
ref NC_009882.1_c1250262-1250714	Proteína hipotética A1G_07480	2,51 (2,41; 2,62)	SNF2_assoc super família [cl07173] - Helicase bacteriana SNF2 associado	9.57e-03

Tabela 7 – Análise de similaridade de proteínas hipotéticas reprimidas pela alimentação sanguínea.

CDS	Anotação	Média do fold change (réplicas biológicas 1; 2)	Busca de domínios - CDD	E-Value
Reprimidas pela alimentação sanguínea				
ref NC_009882.1_c6316-6077	Proteína hipotética A1G_00030	-2,28 (2,39; 2,17)	MazF[COG2337] - Inibidor de crescimento	4.40e-15
ref NC_009882.1_13826-14749	Proteína hipotética A1G_00085	-1,83 (1,98; 1,68)	CE4_RC0012_like[cd10963] - Domínio homólogo à NodB catalítica putativa de <i>Rickettsia conorii</i> e bactérias homólogas	8.64e-114
ref NC_009882.1_32218-32739	Proteína hipotética A1G_00190	-2,74 (2,88; 2,59)	COG1329[COG1329] - Reguladores de transcrição, similar a CarD do <i>Myxococcus xanthus</i>	2.39e-72
ref NC_009882.1_137058-140018	Proteína hipotética A1G_00820	-1,83 (1,88; 1,78)	VirB6[COG3704] Componente VirB6 do Sistema de secreção tipo IV	3.76e-101
ref NC_009882.1_140005-141990	Proteína hipotética A1G_00825	-1,68 (1,77; 1,59)	VirB6[COG3704] - Componente VirB6 do Sistema de secreção tipo IV	9.75e-103
ref NC_009882.1_c199098-196984	Proteína hipotética A1G_01070	-1,67 (1,65; 1,69)	polC[PRK00448], DNA polimerase III PolC validada	5.33e-03
ref NC_009882.1_210439-210642	Proteína hipotética A1G_01135	-1,93 (1,96; 1,89)	DUF2674[pfam10879] - Proteína de função desconhecida (DUF2674) conservada em <i>Rickettsia</i> spp	2.24e-46
ref NC_009882.1_c346202-345054	Proteína hipotética A1G_01945	-1,70 (1,87; 1,52)	Super família AgrB [cl01873] - Gene acessório regulador B	8.85e-04
ref NC_009882.1_384409-384507	Proteína hipotética A1G_02175	-2,62 (2,47; 2,76)	PRK06588[PRK06588] - Subunidade D do putativo antiporter monovalente cation/H+	3.48e-23
ref NC_009882.1_c413519-412539	Proteína hipotética A1G_02330	-2,87 (2,91; 2,84)	Super família Nucleotid_trans [cl05288] - Nucleotide-difosfo-açúcar transferase	7.40e-04
ref NC_009882.1_c439531-439259	Proteína hipotética A1G_02495	-2,08 (2,35; 1,81)	flgK_ends[TIGR02492] - Proteína flagelar FlgK	9.61e-03
ref NC_009882.1_c462530-461532	Proteína hipotética A1G_02620	-1,71 (1,75; 1,67)	AcrA[COG0845] - Proteína de fusão à membrana	1.20e-31
ref NC_009882.1_495812-496729	Proteína hipotética A1G_02820	-1,80 (1,66; 1,84)	COG2984[COG2984] - Componente periplasmático do sistema de transporte tipo ABC não caracterizado	1.35e-97
ref NC_009882.1_c499229-498807	Proteína hipotética A1G_02840	-3,03 (3,30; 2,77)	ANK[cd00204] - repetições de ankirina	1.50e-08
ref NC_009882.1_524000-524968	Proteína hipotética A1G_03000	-7,20 (8,32; 6,07)	Fic[pfam02661] - Família Fic/DOC de processos de filamentos induzidas por cAMP	2.07e-22
ref NC_009882.1_c533894-533406	Proteína hipotética A1G_03050	-2,67 (3,04; 2,31)	BON[pfam04972] - Domínio BON encontrado em uma família de proteínas de proteção ao choque térmico	3.58e-13
ref NC_009882.1_c535744-534896	Proteína hipotética A1G_03065	-2,43 (2,81; 2,05)	Família FTR1[pfam03239] - Ferro permease, família FTR1	9.12e-60
ref NC_009882.1_c536134-535754	Proteína hipotética A1G_03070	-1,97 (2,20; 1,73)	Cupredoxina_1[pfam13473] - Domínio cupredoxina-like	5.13e-37
ref NC_009882.1_c537320-536325	Proteína hipotética A1G_03075	-3,04 (3,65; 2,43)	FKBP_C[pfam00254] - Isomerase tipo FKBP peptidil-prolil cis-trans	4.61e-07
ref NC_009882.1_c727231-727037	Proteína hipotética A1G_04255	-2,84 (3,02; 2,67)	DUF4143[pfam13635] - Domínio de função desconhecida (DUF4143) encontrada na família ATPase	1.37e-06
ref NC_009882.1_c727818-727639	Proteína hipotética A1G_04270	-6,59 (6,03; 7,16)	Super família [P-loop_NTPase]cl09099] - Hidrolase nucleotídica trifosfato	6.62e-03
ref NC_009882.1_c730245-729259	Proteína hipotética A1G_04280	-7,35 (7,85; 6,86)	Peptidase_S66[cd07025] - LD-Carboxipeptidase, uma serino protease	9.72e-51
ref NC_009882.1_c733692-733087	Proteína hipotética A1G_04305	-4,36 (4,91; 3,82)	ANK[cd00204] - repetições de ankirina	6.67e-06
ref NC_009882.1_767346-770225	Proteína hipotética A1G_04555	-1,68 (1,66; 1,72)	Pentapeptide[pfam00805] - Repetições de pentapeptídeos (8 cópias) encontrado em proteínas cianobactérias	1.99e-06
ref NC_009882.1_774111-774803	Proteína hipotética A1G_04585	-3,32 (3,52; 3,13)	COG1214[COG1214] - Homólogo inativo da protease dependente de metal, chaperona molecular putativa	5.47e-58
ref NC_009882.1_c868072-867395	Proteína hipotética A1G_05140	-2,28 (2,16; 2,39)	Radical_SAM[cd01335] - Super família Radical SAM	8.62e-06
ref NC_009882.1_c947519-946632	Proteína hipotética A1G_05640	-2,10 (2,38; 1,81)	Super família SurA_N_3[cl07813] - Domínio N-terminal SurA	2.06e-12
ref NC_009882.1_983971-984123	Proteína hipotética A1G_05920	-2,20 (2,36; 2,02)	DUF2269[pfam10027] - Proteína predita integral de membrana (DUF2269)	2.72e-13
ref NC_009882.1_c987677-987333	Proteína hipotética A1G_05940	-2,70 (2,81; 2,59)	HicB[pfam05534] - Família HicB	3.58e-16
ref NC_009882.1_992452-993807	Proteína hipotética A1G_05965	-2,50 (2,76; 2,23)	MacB_PCD[pfam12704] - Domínio periplasmático MacB-like dos transportadores ABC	1.44e-23
ref NC_009882.1_c1015646-1014858	Proteína hipotética A1G_06080	-4,51 (4,90; 4,13)	DUF519[pfam04378] - Proteína bacteriana de função desconhecida (DUF519), possivelmente secretada	3.00e-116
ref NC_009882.1_1043231-1043452	Proteína hipotética A1G_06275	-1,67 (1,66; 1,67)	COG4100[COG4100] - Proteína da família da cistationa beta-liase envolvida na resistência a alumínio	6.60e-03
ref NC_009882.1_c1050287-1049916	Proteína hipotética A1G_06330	-2,69 (2,86; 2,52)	ycf1[CHL00204] - Provisional Ycf1	7.56e-05
ref NC_009882.1_c1052108-1051542	Proteína hipotética A1G_06355	-2,39 (2,72; 2,05)	PDDEXK_2[pfam12784] - Nuclease transposase PD-(D/E)XK	1.29e-23
ref NC_009882.1_1117305-1117733	Proteína hipotética A1G_06700	-2,62 (2,95; 2,28)	TH_XRE[cd00093], Helix-turn-helix da família de proteínas XRE-like	5.36e-08
ref NC_009882.1_c1164928-1163354	Proteína hipotética A1G_06985	-1,84 (2,01; 1,66)	Rotamase_2[pfam13145], Domínio PPIC-tipo PPIASE	4.55e-11
ref NC_009882.1_c1175920-1175135	Proteína hipotética A1G_07015	-1,80 (1,71; 1,88)	COG1835[COG1835] - Aciltransferase predita	2.38e-18
ref NC_009882.1_1237534-1238550	Proteína hipotética A1G_07385	-2,11 (2,28; 1,94)	YjgP_YjgQ[pfam03739] - Permease predita da família YjgP/YjgQ	1.11e-59
ref NC_009882.1_c1241821-1241363	Proteína hipotética A1G_07415	-2,36 (2,43; 2,29)	HsdM[COG0286] - Subunidade metiltransferase do sistema de restrição/modificação tipo 1	1.34e-17

4.4 Confirmação do perfil de expressão de *R. rickettsii* infectando fêmeas de *A. aureolatum*

A fim de confirmar os perfis de modulação dos genes *R. rickettsii* obtidos pela metodologia de microarranjos, selecionamos sete CDS moduladas pela temperatura e dez moduladas pela alimentação sanguínea para uma análise por RT-qPCR. A metionil tRNA sintetase (A1G_05810) foi utilizada para a normalização das quantidade de cDNA nas amostras, uma vez que apresentou os mesmos níveis de transcrição em todas as réplicas biológicas e condições avaliadas pelos microarranjos. Além disso, apresentou a menor variância dos valores de Cts entre as amostras nos experimentos de RT-qPCR. A eficiência dos oligonucleotídeos, determinada previamente às análises, variou entre 89 e 99%, permitindo a determinação dos valores de *fold-change* pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Avaliamos cinco réplicas biológicas independentes (fêmeas inteiras de *A. aureolatum*) de cada grupo analisado nos experimentos de microarranjo: G1 (carrapatos não alimentados e mantidos a 25 °C), G2 (carrapatos não alimentados e mantidos a 35 °C) e G3 (carrapatos alimentados em cães por 3 dias). Os resultados de RT-qPCR tiveram uma correlação de 100% com os resultados previamente obtidos pelos microarranjos (**Tabela 8**). Dos 17 genes avaliados, 13 (76,47%) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos respectivos controles (G1 para a análise dos efeitos da elevação da temperatura e G2 para análise dos efeitos da alimentação sanguínea).

Tabela 8 – Validação dos dados de modulação dos microarranjos por RT-qPCR.

	CDS	Anotação	RT-qPCR Fold-change $\pm$ SD (* $p < 0,05$)	Modulação no microarray
CDS moduladas pela temperatura	ref NC_009882.1_:991314-992378	Proteína de resistência a bicilomicina	1,81 $\pm$ 0,13*	↑
	ref NC_009882.1_:487702-488622	Recombinase XerD tirosina sítio-específica	1,58 $\pm$ 0,09*	↑
	ref NC_009882.1_:c944176-943964	Proteína de choque frio- <i>like</i>	1,31 $\pm$ 0,13	↑
	ref NC_009882.1_:524000-524968	Proteína hipotética A1G_03000	2,16 $\pm$ 0,03*	↑
	ref NC_009882.1_:652833-655895	Antígeno de superfície	0,48 $\pm$ 0,33*	↓
	ref NC_009882.1_:c1249026-1247194	Proteína de reparo e emparelhamento de DNA	0,60 $\pm$ 0,37*	↓
	ref NC_009882.1_:1250262-1250714	Proteína hipotética A1G_07480	0,62 $\pm$ 0,60	↓
CDS moduladas pela alimentação sanguínea	ref NC_009882.1_:c269892-269554	Ferredoxina	1,66 $\pm$ 0,48*	↑
	ref NC_009882.1_:275087-275395	Glutarredoxina 3	2,37 $\pm$ 0,35	↑
	ref NC_009882.1_:c390274-389576	Proteína virB8	2,68 $\pm$ 1,07*	↑
	ref NC_009882.1_:392342-393790	Proteína virB10	1,50 $\pm$ 0,56	↑
	ref NC_009882.1_:393787-394791	Proteína virB11	3,46 $\pm$ 1,58*	↑
	ref NC_009882.1_:1051294-1051470	Proteína hipotética A1G_06350	2,07 $\pm$ 0,96*	↑
	ref NC_009882.1_:45976-46317	Antígeno- <i>like</i> de superfície Sca10	0,35 $\pm$ 0,15*	↓
	ref NC_009882.1_:c901984-901727	Chaperonina GroEL	0,68 $\pm$ 0,13*	↓
	ref NC_009882.1_:134020-134307	Proteína VirB3 do sistema de secreção tipo IV	0,49 $\pm$ 0,16*	↓
	ref NC_009882.1_:524000-524968	Proteína hipotética A1G_03000	0,15 $\pm$ 0,05*	↓

4.5 Perfil de expressão de genes de *R. rickettsii* modulados pela temperatura e alimentação sanguínea em glândulas salivares e intestinos de carrapatos *A. aureolatum*

Com o objetivo de investigar a influência da elevação da temperatura e da exposição à alimentação sanguínea sobre o perfil transcricional de *R. rickettsii* em tecidos específicos do carrapato *A. aureolatum*, realizamos experimentos de RT-qPCR microfluídica em larga escala. Para tal, fêmeas e machos infectados foram submetidos às mesmas condições anteriores: não alimentados e incubados a 25 °C (G1) ou a 35 °C (G2) por 3 dias ou alimentados em cães por 3 dias (G3). As glândulas salivares (SG) e intestino (MG) de cada exemplar foram dissecados e utilizados para a extração simultânea de RNA total e de DNA genômico. O número de bactérias por tecido foi quantificado por qPCR com sonda TaqMan específica para o gene *gltA*.

Dez amostras de SG e MG de fêmeas e de machos contendo em média $2,81 \pm 2,35 \times 10^7$ e $1,54 \pm 1,70 \times 10^7$ bactérias, respectivamente, foram selecionadas para a análise do perfil transcricional de 95 genes (**Apêndice B**). Os genes analisados foram selecionados com base nos resultados das análises por microarranjos ou com base nos dados da literatura de fatores de virulência bacterianos, genes envolvidos no processo de estresse oxidativo, entre outros (Beckwith, 2013; Chan et al., 2009; Heinzen et al., 1993; Hendrick, Hartl, 1993; Li, Walker, 1998; Rahman et al., 2005; Rahman et al., 2013; Rikihisa, Lin, 2010; Uchiyama et al., 2006; Uchiyama, 2012; Walker et al., 2001; Winkler, 1976).

Os dados obtidos pelas reações foram inicialmente analisados pelo programa Fluidigm Real-Time PCR Analysis (Fluidigm Corporation). Os pares de oligonucleotídeos que não atingiram os valores mínimos de qualidade e que apresentaram eficiência menor que 89% ou que geraram mais de um produto de amplificação (*amplicon*) na curva de dissociação (*melting curve*) foram descartados das análises. Após a aplicação desses filtros, obtivemos o *threshold cycle* (Ct) de 70 genes, os quais seguiram para as análises de expressão.

Para selecionar o gene de referência mais adequado, utilizamos o programa NormFinder <<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>> (Andersen et al., 2004). Após a aplicação desse algoritmo, detectamos três genes com expressão constitutiva nas 120 amostras e que apresentaram os menores valores de estabilidade (*stability value*) e de erro-padrão [ribonuclease H (A1G_06145), proteína

de montagem de superfície (A1G_02675) e proteína J do estágio 0 da esporulação (A1G_00545)]. A média desses três genes foi utilizada para o primeiro processo de normalização das quantidades de cDNA nas amostras. De maneira a quantificar a modulação gênica bacteriana em cada tecido analisado, utilizamos o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Não observamos diferença no perfil de expressão gênica de *R. rickettsii* infectando machos em relação a fêmeas. Dessa maneira, pudemos utilizar cada exemplar (macho ou fêmea) como uma réplica biológica nas análises.

Para determinar os efeitos da elevação da temperatura, comparamos a expressão de *R. rickettsii* em G2 (carrapatos não alimentados mantidos a 35 °C) e G1 (carrapatos não alimentados mantidos a 25 °C). Observamos que genes relacionados à virulência bacteriana, como proteínas de superfície e componentes do T4SS, além de possíveis efetores deste sistema de secreção (ankirinas), estão mais expressos nas glândulas salivares do que nos intestinos independentemente do gênero analisado (**Figura 9**). Considerando-se apenas genes com *fold-changes* $\geq 1,5$ e *p-values* $\leq 0,05$, observamos que a elevação da temperatura em 10 °C modulou 19 genes (14 induzidos e 5 reprimidos) nas glândulas salivares e 9 genes (2 induzidos e 7 reprimidos) nos intestinos (**Tabela 9**).

Figura 9 - Efeitos da temperatura sobre o perfil de expressão gênica de *R. rickettsii* infectando glândulas salivares (SG) e intestinos (MG) de machos e fêmeas de *A. aureolatum*.

Nota: Os dados foram obtidos pelas análises de RT-qPCR microfluídica. A representação gráfica de *heat-map* representa genes mais expressos em vermelho e menos expresso em verde.

Tabela 9 - CDS de *R. rickettsii* diferencialmente expressas pela exposição à elevação de temperatura em tecidos de *A. aureolatum* adultos.

Tecido	Perfil de modulação	Identificação do gene	CDS	Anotação	Fold-change	P-value
Glândula salivar	Induzidos	A1G_00010	ref NC_009882.1_:1082-1399	tioredoxina	1,504	0,0000
		A1G_00070	ref NC_009882.1_:c11968-11702	proteína contendo domínios repetidos de anquirina	2,790	0,0000
		A1G_01005	ref NC_009882.1_:177150-177350	componente E da via de secreção de proteína dependente de Sec	1,602	0,0000
		A1G_01255	ref NC_009882.1_:232567-232908	proteína contendo domínios repetidos de anquirina	1,628	0,0010
		A1G_02115	ref NC_009882.1_:c373645-373484	proteína de superfície externa A (ompA)	1,557	0,0134
		A1G_02210	ref NC_009882.1_:c390274-389576	proteína VirB8	1,664	0,0000
		A1G_02360	ref NC_009882.1_:418652-418861	proteína hipotética A1G_02360	1,702	0,0018
		A1G_02785	ref NC_009882.1_:487702-488622	recombinase XerD tirosina sítio-específica	1,574	0,0005
		A1G_02865	ref NC_009882.1_:500770-502338	lisil tRNA sintetase	1,863	0,0000
		A1G_02955	ref NC_009882.1_:513850-514026	proteína contendo domínios repetidos de anquirina	2,155	0,0007
		A1G_03005	ref NC_009882.1_:525229-525366	proteína hipotética A1G_03005	1,759	0,0001
		A1G_04915	ref NC_009882.1_:c830629-830507	proteína hipotética A1G_04915	2,179	0,0022
		A1G_06440	ref NC_009882.1_:c1061923-1061801	proteína hipotética A1G_06440	2,249	0,0019
		A1G_06915	ref NC_009882.1_:c1153524-1153240	antígeno-like de superfície Sca13	1,671	0,0383
	Reprimidos	A1G_00295	ref NC_009882.1_:45976-46317	antígeno-like de superfície Sca10	0,409	0,0000
		A1G_01335	ref NC_009882.1_:c248307-246424	chaperona molecular DnaK	0,563	0,0000
		A1G_03790	ref NC_009882.1_:652833-655895	antígeno de superfície	0,428	0,0000
		A1G_07170	ref NC_009882.1_:c1203242-1201938	citrato sintase tipo II	0,558	0,0000
		Rrlowa_1080	ref NC_010263.2_:c856717-858162	proteína RickA de ativação do complexo Arp2/3	0,573	0,0000
Intestinos	Induzidos	A1G_01005	ref NC_009882.1_:177150-177350	componente E da via de secreção de proteína dependente de Sec	1,521	0,0000
		A1G_06440	ref NC_009882.1_:c1061923-1061801	proteína hipotética A1G_06440	1,659	0,0459
	Reprimidos	A1G_00295	ref NC_009882.1_:45976-46317	antígeno-like de superfície Sca10	0,599	0,0004
		A1G_01335	ref NC_009882.1_:c248307-246424	chaperona molecular DnaK	0,629	0,0001
		A1G_03490	ref NC_009882.1_:608404-609831	semialdeído succinato desidrogenase	0,614	0,0000
		A1G_03790	ref NC_009882.1_:652833-655895	antígeno de superfície	0,409	0,0000
		A1G_06915	ref NC_009882.1_:c1153524-1153240	antígeno-like de superfície Sca13	0,361	0,0076
		A1G_07170	ref NC_009882.1_:c1203242-1201938	citrato sintase tipo II	0,544	0,0000
		A1G_07470	ref NC_009882.1_:c1249026-1247194	proteína de reparo de emparelhamento de DNA	0,557	0,0000

Nota: A análise transcricional foi realizada por RT-qPCR microfluídica.

Por fim, identificamos os conjuntos de genes modulados apenas nas glândulas salivares ou apenas nos intestinos dos carrapatos, de modo a criar uma assinatura gênica tecido-específica da bactéria frente à elevação da temperatura (**Figura 10**). Como componentes desta assinatura bacteriana, identificamos 12 genes (11 induzidos e 1 reprimido) que foram exclusivamente modulados em glândulas salivares e 2 genes reprimidos exclusivamente em intestinos. Portanto, além do aumento da temperatura em 10 °C ter induzido a expressão de um número maior de genes nas glândulas salivares em comparação com o intestino (**Figura 9**), a assinatura das glândulas salivares frente a este estímulo também foi mais expressiva (**Figura 10**). Dentro desta assinatura, além de CDS de proteínas com função anotada, identificamos três CDS de proteínas hipotéticas. Duas delas (A1G_03005 e A1G_04915) não possuem nenhum domínio conservado descrito no CDD (*Conserved Domain Database*), enquanto a proteína hipotética A1G_02360 possui identidade com o domínio de ligação de ATP do fator de alongação 3 (*e-value* 2.19E-24). Assim, podemos assumir que o aumento de 10 °C na temperatura modula diferencialmente a expressão nas glândulas e nos intestinos de *R. rickettsii* infectando *A. aureolatum* não alimentados. Esses genes podem ser utilizados no futuro como marcadores teciduais da exposição da bactéria à elevação da temperatura.

Figura 10 - Assinatura gênica tecido-específica de *R. rickettsii* quando exposta à elevação da temperatura em 10 °C.

Nota: Os dados foram obtidos pelas análises de RT-qPCR microfluídica. O diagrama de Venn representa os conjuntos gênicos específicos de *R. rickettsii* em cada tecido do carrapato analisado e sua intersecção. Nas glândulas salivares, a assinatura é composta pelas CDS de três proteínas contendo domínios repetidos de ankirina (Ank1, Ank2 e Ank5), da proteína de superfície externa A (*ompA*), da proteína VirB8, da tiorredoxina, da recombinase XerD tirosina sítio-específica, da lisil t-RNA sintetase, de três proteínas hipotéticas A1G_2360, A1G_4915, A1G3005, e da proteína RickA de ativação do complexo Arp2/3. Em intestinos, a assinatura é composta pelas CDS da semi-aldeído succinato desidrogenase e da proteína de reparo e emparelhamento de DNA (*DNA mismatch*). Em vermelho, CDS induzidas e em verde, CDS reprimidas.

Para determinar os efeitos da alimentação sanguínea sobre a expressão da bactéria em tecidos específicos do seu vetor, comparamos a expressão em G3 (carrapatos alimentados) versus G2 (carrapatos não alimentados e mantidos a 35 °C). De maneira geral, a alimentação sanguínea também promoveu a modulação dos 70 genes analisados (**Figura 11**). Considerando como genes diferencialmente expressos aqueles com *fold-changes* $\geq 1,5$ e *p-values* $\leq 0,05$, a aquisição da alimentação sanguínea modulou 28 genes (5 induzidos e 23 reprimidos) nas glândulas salivares (**Tabela 10**) e 35 genes (15 induzidos e 20 reprimidos) nos intestinos (**Tabela 11**). Assim como na elevação da temperatura, conseguimos montar um conjunto de genes diferencialmente expressos apenas nas glândulas salivares ou no intestino. Dessa forma, conseguimos definir uma assinatura gênica tecido-específica da bactéria frente ao repasto sanguíneo realizado pelo carrapato-vetor. Como componentes dessa assinatura, 5 genes foram exclusivamente modulados em glândulas salivares (1 induzido e 4 reprimidos) e 12 genes exclusivamente modulados em intestinos (11 induzidos e 1 reprimidos) (**Figura 12**). Diferentemente da elevação de temperatura, a alimentação sanguínea promoveu a

modulação de um número maior de genes nos intestinos do que nas glândulas salivares. Além das proteínas com função anotada, identificamos três proteínas hipotéticas nas assinaturas, duas em glândulas salivares e uma nos intestinos. Destas, apenas a proteína hipotética A1G_6350 possui domínio de proteína secretada com função desconhecida (COG5510), segundo a busca por domínios conservados no CDD (*Conserved Domain Database*).

Figura 11 - Efeitos da alimentação sanguínea sobre o perfil de expressão gênica de *R. rickettsii* infectando glândulas salivares (SG) e intestinos (MG) de machos e fêmeas de *A. aureolatum*.

Nota: Os dados foram obtidos pelas análises de RT-qPCR microfluídica. A representação gráfica de *heat-map* representa genes mais expressos em vermelho e menos expressos em verde.

Tabela 10 - CDS de *R. rickettsii* diferencialmente expressas pela exposição à alimentação sanguínea nas glândulas salivares de *A. aureolatum* adultos.

Perfil de modulação	Identificação do gene	CDS	Anotação	Fold-change	P-value
Induzidos	A1G_00180	ref NC_009882.1:c31143-30847	proteína hipotética A1G_00180	1,60	0,0000
	A1G_02555	ref NC_009882.1:c450224-449622	tioredoxina peroxidase 1	1,55	0,0000
	A1G_06350	ref NC_009882.1:1051294-1051470	proteína hipotética A1G_06350	1,55	0,0005
	A1G_06745	ref NC_009882.1:c1127890-1127534	proteína hipotética A1G_06745	1,68	0,0000
	A1G_07480	ref NC_009882.1:1250262-1250714	proteína hipotética A1G_07480	2,40	0,0000
Reprimidos	A1G_00295	ref NC_009882.1:45976-46317	antígeno-like de superfície Sca10	0,35	0,0000
	A1G_00530	ref NC_009882.1:79249-81117	enzima de modificação GidA tRNA uridine 5-carboximetilaminometil	0,43	0,0000
	A1G_01255	ref NC_009882.1:232567-232908	proteína contendo domínios repetidos de anquirina	0,63	0,0034
	A1G_01335	ref NC_009882.1:c248307-246424	chaperona molecular DnaK	0,55	0,0000
	A1G_01440	ref NC_009882.1:262509-262940	antígeno-like de superfície Sca8	0,29	0,0000
	A1G_01545	ref NC_009882.1:c277476-277213	DNA girase subunidade A	0,41	0,0001
	A1G_02115	ref NC_009882.1:c373645-373484	proteína de superfície externa A (ompA)	0,37	0,0009
	A1G_02385	ref NC_009882.1:c421714-421487	proteína hipotética A1G_02385	0,62	0,0085
	A1G_02785	ref NC_009882.1:487702-488622	recombinase XerD tirosina sítio-específica	0,34	0,0000
	A1G_03000	ref NC_009882.1:524000-524968	proteína hipotética A1G_03000	0,24	0,0000
	A1G_03005	ref NC_009882.1:525229-525366	proteína hipotética A1G_03005	0,39	0,0000
	A1G_03570	ref NC_009882.1:c621997-621737	proteína hipotética A1G_03570	0,38	0,0000
	A1G_04280	ref NC_009882.1:c730245-729259	proteína hipotética A1G_04280	0,25	0,0000
	A1G_04750	ref NC_009882.1:c803667-803269	proteína de divisão celular FtsL	0,64	0,0001
	A1G_04915	ref NC_009882.1:c830629-830507	proteína hipotética A1G_04915	0,53	0,0005
	A1G_05165	ref NC_009882.1:c871627-869777	proteína hipotética A1G_05165	0,36	0,0023
	A1G_05210	ref NC_009882.1:c881085-879286	proteína reguladora de nitrogênio NtrY	0,41	0,0000
	A1G_05315	ref NC_009882.1:c901984-901727	chaperonina GroEL	0,39	0,0000
	A1G_05960	ref NC_009882.1:991314-992378	proteína biciclomicina de resistência	0,25	0,0000
	A1G_06440	ref NC_009882.1:c1061923-1061801	proteína hipotética A1G_06440	0,66	0,0243
	A1G_06915	ref NC_009882.1:c1153524-1153240	antígeno-like de superfície Sca13	0,36	0,0001
	A1G_07375	ref NC_009882.1:1236834-1237097	proteína J induzida por danos ao DNA	0,50	0,0001
	Rrlowa_1080	ref NC_010263.2:c856717-858162	proteína RickA de ativação do complexo Arp2/3	0,46	0,0000

Nota: A análise transcricional foi realizada por RT-qPCR microfluídica.

Tabela 11 - CDS de *R. rickettsii* diferencialmente expressas pela exposição à alimentação sanguínea nos intestinos de *A. aureolatum* adultos.

Perfil de modulação	Identificação do gene	CDS	Anotação	Fold-change	P-value
Induzidos	A1G_00180	ref NC_009882.1_:c31143-30847	proteína hipotética A1G_00180	1,70	0,0000
	A1G_02210	ref NC_009882.1_:c390274-389576	proteína VirB8	1,88	0,0000
	A1G_02225	ref NC_009882.1_:391686-392159	proteína VirB9	1,70	0,0000
	A1G_02230	ref NC_009882.1_:392342-393790	proteína VirB10	1,68	0,0000
	A1G_02235	ref NC_009882.1_:393787-394791	proteína VirB11	2,31	0,0000
	A1G_02240	ref NC_009882.1_:394925-396700	proteína VirD4	1,87	0,0000
	A1G_02555	ref NC_009882.1_:c450224-449622	tiorredoxina peroxidase 1	1,64	0,0000
	A1G_03375	ref NC_009882.1_:c591845-591552	proteína hipotética A1G_03375	2,81	0,0017
	A1G_03930	ref NC_009882.1_:676576-677049	fator de iniciação da tradução IF-3	1,74	0,0000
	A1G_04935	ref NC_009882.1_:832252-832677	preproteína translocase subunidade YajC	1,54	0,0000
	A1G_06030	ref NC_009882.1_:c1007464-1002500	proteína de superfície externa B (ompB)	1,95	0,0000
	A1G_06670	ref NC_009882.1_:1107497-1109929	proteína precursora de VirB4	1,66	0,0000
	A1G_06745	ref NC_009882.1_:c1127890-1127534	proteína hipotética A1G_06745	1,87	0,0000
	A1G_07470	ref NC_009882.1_:c1249026-1247194	proteína de reparo de emparelhamento de DNA	1,58	0,0001
	A1G_07480	ref NC_009882.1_:1250262-1250714	proteína hipotética A1G_07480	2,60	0,0000
Reprimidos	A1G_00295	ref NC_009882.1_:45976-46317	antígeno-like de superfície Sca10	0,40	0,0000
	A1G_00530	ref NC_009882.1_:79249-81117	enzima de modificação GidA tRNA uridine 5-carboximetilaminometil	0,54	0,0003
	A1G_00685	ref NC_009882.1_:115915-116844	fator de alongação Ts	0,63	0,0001
	A1G_01255	ref NC_009882.1_:232567-232908	proteína contendo domínios repetidos de anquirina	0,64	0,0107
	A1G_01440	ref NC_009882.1_:262509-262940	antígeno-like de superfície Sca8	0,35	0,0000
	A1G_01545	ref NC_009882.1_:c277476-277213	DNA girase subunidade A	0,54	0,0003
	A1G_02115	ref NC_009882.1_:c373645-373484	proteína de superfície externa A (ompA)	0,60	0,0126
	A1G_02385	ref NC_009882.1_:c421714-421487	proteína hipotética A1G_02385	0,57	0,0001
	A1G_02785	ref NC_009882.1_:487702-488622	recombinase XerD tirosina sítio específica	0,42	0,0000
	A1G_03000	ref NC_009882.1_:524000-524968	proteína hipotética A1G_03000	0,24	0,0000
	A1G_03005	ref NC_009882.1_:525229-525366	proteína hipotética A1G_03005	0,42	0,0000
	A1G_03570	ref NC_009882.1_:c621997-621737	proteína hipotética A1G_03570	0,52	0,0013
	A1G_04280	ref NC_009882.1_:c730245-729259	proteína hipotética A1G_04280	0,22	0,0000
	A1G_05165	ref NC_009882.1_:c871627-869777	proteína hipotética A1G_05165	0,53	0,0220
	A1G_05210	ref NC_009882.1_:c881085-879286	proteína reguladora de nitrogênio NtrY	0,43	0,0000
	A1G_05315	ref NC_009882.1_:c901984-901727	chaperonina GroEL	0,63	0,0004
	A1G_05960	ref NC_009882.1_:991314-992378	proteína biciclomicina de resistência	0,31	0,0000
	A1G_06440	ref NC_009882.1_:c1061923-1061801	proteína hipotética A1G_06440	0,61	0,0042
	A1G_07375	ref NC_009882.1_:1236834-1237097	proteína J induzida por danos ao DNA	0,49	0,0022
	Rrlowa_1080	ref NC_010263.2_:c856717-858162	proteína RickA de ativação do complexo Arp2/3	0,54	0,0001

Nota: A análise transcricional foi realizada por RT-qPCR microfluídica.

Figura 12 - Assinatura gênica tecido-específica de *R. rickettsii* quando exposta à alimentação sanguínea.

Nota: Os dados foram obtidos pelas análises de RT- qPCR microfluídica. O diagrama de Venn representa os conjuntos gênicos específicos de *R. rickettsii* em cada tecido do carrapato e sua intersecção. Nas glândulas salivares, a assinatura é composta pelas CDS das proteínas hipotéticas A1G_06350 e A1G_04915, além da chaperona molecular DnaK, da proteína de divisão celular FtsL e do antígeno-*like* de superfície Sca13. Em intestinos, a assinatura é composta pelas CDS da proteína de superfície externa B (ompB), de 6 componentes do sistema de secreção do tipo IV (VirB4, VirB8, VirB9, VirB10, VirB11, VirD4), do fator de iniciação da tradução IF-3, da subunidade YarjC da pré-proteína translocase, da proteína de reparo e emparelhamento de DNA (DNA *mismatch*), da proteína hipotética A1G_03375 e do fator de enlongação Ts. Em vermelho, CDS induzidas e em verde, CDS reprimidas pela condição biológica analisada.

Para avaliar os efeitos aditivos da temperatura e da alimentação sanguínea, analisamos comparativamente os níveis transcricionais da bactéria infectando os tecidos de *A. aureolatum* adultos não alimentados e incubados a 25°C (G1) versus carrapatos alimentados (G3). Os efeitos do aumento de temperatura combinados com a exposição à alimentação foram semelhantes aos efeitos da alimentação isoladamente quanto ao número e às CDS moduladas. Esses dados reforçam a premissa de que a elevação de temperatura, por si só, não tem um efeito tão significativo sobre os níveis transcricionais da bactéria quanto a alimentação sanguínea. Considerando-se *fold-changes* $\geq 1,5$ e *p-values* $\leq 0,05$, a elevação da temperatura somada à alimentação sanguínea modularam a expressão de 32 genes nas glândulas salivares (10 induzidos e 22 reprimidos) (**Tabela 12**) e 36 no intestino (13 induzidos e 23 reprimidos) (**Tabela 13**). A maioria dos genes (26) apresentou o mesmo perfil de modulação nos dois tecidos analisados. Dentre os genes modulados, 6 (3 induzidos e 3 reprimidos) caracterizam a assinatura gênica de *R. rickettsii* nas glândulas salivares enquanto 10 (6 induzidos e 4 reprimidos) caracterizam a assinatura nos intestinos (**Figura 13**). Dentre as proteínas hipotéticas

que compõem essas assinaturas, uma delas (A1G_06350), modulada em glândulas salivares, também faz parte da assinatura de *R. rickettsii* infectando glândulas salivares expostas apenas à alimentação sanguínea. Como mencionado anteriormente, essa proteína possui domínio de proteína secretada de função desconhecida. A indução da proteína contendo domínios repetidos de ankirina 5 (Ank5), também faz parte desta assinatura. Conforme também já mencionado anteriormente, proteínas com domínio de ankirina são potenciais efetores do T4SS. Dentre as duas proteínas hipotéticas que compõem a assinatura gênica de *R. rickettsii* nos intestinos, a A1G_03005 não possui nenhum domínio conservado descrito enquanto a A1G_06745 possui domínio de proteína predita de membrana com função desconhecida (*e-value* 3.91e-67) (COG3671).

Tabela 12 - CDS de *R. rickettsii* diferencialmente expressas nas glândulas salivares de *A. aureolatum* adultos pelo efeito aditivo da elevação de temperatura e da alimentação sanguínea.

Perfil de modulação	Identificação do gene	CDS	Anotação	Fold-change	P-value
Induzidos	A1G_00070	ref NC_009882.1:c11968-11702	proteína contendo domínios repetidos de ankirina	1,89	0,0166
	A1G_00010	ref NC_009882.1:1082-1399	tiorredoxina	1,98	0,0000
	A1G_00180	ref NC_009882.1:c31143-30847	proteína hipotética A1G_00180	2,07	0,0000
	A1G_01005	ref NC_009882.1:177150-177350	componente E da via de secreção de proteína dependente de Sec	1,60	0,0000
	A1G_02210	ref NC_009882.1:c390274-389576	proteína VirB8	2,19	0,0000
	A1G_02555	ref NC_009882.1:c450224-449622	tiorredoxina peroxidase 1	2,09	0,0000
	A1G_03375	ref NC_009882.1:c591845-591552	proteína hipotética A1G_03375	3,01	0,0174
	A1G_06350	ref NC_009882.1:1051294-1051470	proteína hipotética A1G_06350	1,64	0,0000
	A1G_06670	ref NC_009882.1:1107497-1109929	proteína precursora de VirB4	1,77	0,0000
	A1G_07480	ref NC_009882.1:1250262-1250714	proteína hipotética A1G_07480	1,64	0,0000
Reprimidos	A1G_00295	ref NC_009882.1:45976-46317	antígeno-like de superfície Sca10	0,15	0,0000
	A1G_00530	ref NC_009882.1:79249-81117	enzima de modificação GidA tRNA uridine 5-carboximetilaminometil	0,47	0,0000
	A1G_01335	ref NC_009882.1:c248307-246424	chaperona molecular DnaK	0,31	0,0000
	A1G_01440	ref NC_009882.1:262509-262940	antígeno-like de superfície Sca8	0,26	0,0000
	A1G_01545	ref NC_009882.1:c277476-277213	DNA girase subunidade A	0,47	0,0003
	A1G_02115	ref NC_009882.1:c373645-373484	proteína de superfície externa A (ompA)	0,58	0,0184
	A1G_02385	ref NC_009882.1:c421714-421487	proteína hipotética A1G_02385	0,53	0,0018
	A1G_02785	ref NC_009882.1:487702-488622	recombinase XerD tirosina sítio-específica	0,53	0,0000
	A1G_03000	ref NC_009882.1:524000-524968	proteína hipotética A1G_03000	0,32	0,0000
	A1G_03155	ref NC_009882.1:555321-555569	proteína hipotética A1G_03155	0,51	0,0000
	A1G_03570	ref NC_009882.1:c621997-621737	proteína hipotética A1G_03570	0,39	0,0000
	A1G_03790	ref NC_009882.1:652833-655895	antígeno de superfície	0,37	0,0000
	A1G_04280	ref NC_009882.1:c730245-729259	proteína hipotética A1G_04280	0,27	0,0000
	A1G_04750	ref NC_009882.1:c803667-803269	proteína de divisão celular FtsL	0,56	0,0000
	A1G_05165	ref NC_009882.1:c871627-869777	proteína hipotética A1G_05165	0,54	0,0371
	A1G_05210	ref NC_009882.1:c881085-879286	proteína reguladora de nitrogênio NtrY	0,43	0,0000
	A1G_05315	ref NC_009882.1:c901984-901727	chaperonina GroEL	0,38	0,0000
	A1G_05960	ref NC_009882.1:991314-992378	proteína biciclomicina de resistência	0,30	0,0000
	A1G_06165	ref NC_009882.1:1028222-1028911	DNA polimerase II subunidade epsilon	0,65	0,0000
	A1G_07170	ref NC_009882.1:c1203242-1201938	citrato sintase tipo II	0,51	0,0000
	A1G_07375	ref NC_009882.1:1236834-1237097	proteína J induzida por danos ao DNA	0,59	0,0030
	Rrlowa_1080	ref NC_010263.2:c856717-858162	proteína RickA de ativação do complexo Arp2/3	0,27	0,0000

Nota: A análise transcricional foi realizada por RT-qPCR microfluídica.

Tabela 13 – CDS de *R. rickettsii* diferencialmente expressas no intestino de *A. aureolatum* adultos pelo efeito aditivo da elevação de temperatura e da alimentação sanguínea.

Perfil de modulação	Identificação do gene	CDS	Anotação	Fold-change	P-value
Induzidos	A1G_00180	ref NC_009882.1_c31143-30847	proteína hipotética A1G_00180	1,91	0,0000
	A1G_01005	ref NC_009882.1_c177150-177350	componente E da via de secreção de proteína dependente de Sec	1,83	0,0000
	A1G_02210	ref NC_009882.1_c390274-389576	proteína VirB8	2,20	0,0000
	A1G_02235	ref NC_009882.1_c393787-394791	proteína VirB11	1,55	0,0000
	A1G_02240	ref NC_009882.1_c394925-396700	proteína VirD4	1,56	0,0001
	A1G_02555	ref NC_009882.1_c450224-449622	tioredoxina peroxidase 1	1,95	0,0000
	A1G_03375	ref NC_009882.1_c591845-591552	proteína hipotética A1G_03375	3,60	0,0005
	A1G_03930	ref NC_009882.1_c676576-677049	fator de iniciação da tradução IF-3	1,56	0,0000
	A1G_04935	ref NC_009882.1_c832252-832677	preproteína translocase subunidade YajC	1,62	0,0000
	A1G_06030	ref NC_009882.1_c1007464-1002500	proteína de superfície externa B (ompB)	1,86	0,0000
	A1G_06670	ref NC_009882.1_c1107497-1109929	proteína precursora de VirB4	1,79	0,0000
	A1G_06745	ref NC_009882.1_c1127890-1127534	proteína hipotética A1G_06745	1,69	0,0000
	A1G_07480	ref NC_009882.1_c1250262-1250714	proteína hipotética A1G_07480	1,74	0,0000
Reprimidos	A1G_00295	ref NC_009882.1_c45976-46317	antígeno-like de superfície Sca10	0,24	0,0000
	A1G_00530	ref NC_009882.1_c79249-81117	enzima de modificação GidA tRNA uridine 5-carboximetilaminometil	0,47	0,0000
	A1G_00685	ref NC_009882.1_c115915-116844	fator de alongação Ts	0,60	0,0000
	A1G_01335	ref NC_009882.1_c248307-246424	chaperona molecular DnaK	0,45	0,0000
	A1G_01440	ref NC_009882.1_c262509-262940	antígeno-like de superfície Sca8	0,25	0,0000
	A1G_01505	ref NC_009882.1_c272234-271734	proteína co-chaperona HscB	0,59	0,0000
	A1G_01545	ref NC_009882.1_c277476-277213	DNA girase subunidade A	0,59	0,0002
	A1G_02115	ref NC_009882.1_c373645-373484	proteína de superfície externa A (ompA)	0,53	0,0022
	A1G_02385	ref NC_009882.1_c421714-421487	proteína hipotética A1G_02385	0,48	0,0000
	A1G_02785	ref NC_009882.1_c487702-488622	recombinase XerD tirosina sítio-específica	0,46	0,0000
	A1G_03000	ref NC_009882.1_c524000-524968	proteína hipotética A1G_03000	0,35	0,0000
	A1G_03005	ref NC_009882.1_c525229-525366	proteína hipotética A1G_03005	0,50	0,0000
	A1G_03155	ref NC_009882.1_c555321-555569	proteína hipotética A1G_03155	0,54	0,0000
	A1G_03570	ref NC_009882.1_c621997-621737	proteína hipotética A1G_03570	0,40	0,0000
	A1G_03790	ref NC_009882.1_c652833-655895	antígeno de superfície	0,46	0,0000
	A1G_04280	ref NC_009882.1_c730245-729259	proteína hipotética A1G_04280	0,23	0,0000
	A1G_04750	ref NC_009882.1_c803667-803269	proteína de divisão celular FtsL	0,55	0,0000
	A1G_05165	ref NC_009882.1_c871627-869777	proteína hipotética A1G_05165	0,43	0,0047
	A1G_05210	ref NC_009882.1_c881085-879286	proteína reguladora de nitrogênio NtrY	0,39	0,0000
	A1G_05960	ref NC_009882.1_c991314-992378	proteína biciclomicina de resistência	0,33	0,0000
	A1G_06915	ref NC_009882.1_c1153524-1153240	antígeno-like de superfície Sca13	0,52	0,0243
	A1G_07375	ref NC_009882.1_c1236834-1237097	proteína J induzida por danos ao DNA	0,42	0,0000
	Rrlowa_1080	ref NC_010263.2_c856717-858162	proteína RickA de ativação do complexo Arp2/3	0,36	0,0000

Nota: A análise transcricional foi realizada por RT- qPCR microfluídica.

Figura 13 - Assinatura gênica tecido-específica de *R. rickettsii* exposta à elevação da temperatura e à alimentação sanguínea simultaneamente.

Nota: Os dados foram obtidos pelas análises de RT-qPCR microfluídica. O diagrama de Venn representa os conjuntos gênicos específicos de *R. rickettsii* em cada tecido do carrapato e sua intersecção. Nas glândulas salivares, a assinatura é composta pelas CDS da proteína contendo domínios repetidos de anquirina 5 (Ank5), tiorredoxina, proteína hipotética A1G_06350, chaperonina GroEL (GroEL), DNA polimerase III subunidade ε e citrato sintase tipo II. Nos intestinos, a assinatura é composta pelas CDS de dois componentes do sistema de secreção do tipo IV (VirB11 e VirD4), fator de iniciação da tradução IF-3, subunidade YarjC da preproteína translocase, proteína de superfície externa B (OmpB), proteína hipotética A1G_06745, fator de alongação TS, proteína co-chaperona HscB, proteína hipotética A1G_03005 e antígeno-like de superfície Sca13. Em vermelho, CDS induzidas e em verde, CDS reprimidas.

4.6 Expressão gênica de *R. rickettsii* em células BME26

O perfil transcricional de *R. rickettsii* em células BME26 incubadas a 34 °C por 48 horas (fase exponencial de crescimento da bactérias nestas células) também foi avaliado por RT-qPCR. Observamos que todos os 70 genes expressos em tecidos de *A. aureolatum* também estão expressos *in vitro* (**Tabela 14**). Dessa forma, o cultivo celular poderá ser utilizado para estudos posteriores de interação carrapato-*R. rickettsii*.

Tabela 14 – CDS de *R. rickettsii* expressas em células BME26 incubadas a 34 °C.

Identificação do gene	CDS	Anotação	Média de Ct ± SD
A1G_00010	ref NC_009882.1_:1082-1399	tiorredoxina	10,00 ± 0,57
A1G_00070	ref NC_009882.1_:c11968-11702	proteína contendo domínios repetidos de anquirina 5	13,97 ± 0,83
A1G_00180	ref NC_009882.1_:c31143-30847	proteína hipotética A1G_00180	09,64 ± 0,54
A1G_00295	ref NC_009882.1_:45976-46317	antígeno- <i>like</i> de superfície Sca10	12,25 ± 0,55
A1G_00530	ref NC_009882.1_:79249-81117	enzima de modificação GidA tRNA uridine 5-carboximetilaminometil	12,25 ± 0,60
A1G_00545	ref NC_009882.1_:82427-83287	proteína J do estágio 0 da esporulação	9,59 ± 0,48
A1G_00810	ref NC_009882.1_:134020-134307	proteína VirB3 componente do sistema de secreção tipo IV	11,43 ± 0,84
A1G_01150	ref NC_009882.1_:c214853-212547	proteína de superfície externa 1 (omp1)	09,46 ± 0,43
A1G_01255	ref NC_009882.1_:232567-232908	proteína contendo domínios repetidos de anquirina 1	14,25 ± 0,68
A1G_01335	ref NC_009882.1_:c248307-246424	chaperona molecular DnaK	10,25 ± 0,54
A1G_01440	ref NC_009882.1_:262509-262940	antígeno- <i>like</i> de superfície Sca8	17,01 ± 0,88
A1G_01500	ref NC_009882.1_:c271743-269956	chaperona HscA	12,17 ± 0,65
A1G_01505	ref NC_009882.1_:c272234-271734	co-chaperona HscB	12,71 ± 0,73
A1G_01525	ref NC_009882.1_:275087-275395	glutarredoxina 3	11,15 ± 0,55
A1G_01545	ref NC_009882.1_:c277476-277213	DNA girase subunidade A	16,22 ± 0,74
A1G_02035	ref NC_009882.1_:361975-362622	proteína B exportadora de heme	12,58 ± 0,55
A1G_02115	ref NC_009882.1_:c373645-373484	proteína de superfície externa A (ompA)	16,92 ± 0,87
A1G_02210	ref NC_009882.1_:c390274-389576	proteína VirB8	14,56 ± 0,94
A1G_02225	ref NC_009882.1_:391686-392159	proteína VirB9	12,33 ± 0,73
A1G_02230	ref NC_009882.1_:392342-393790	proteína VirB10	11,54 ± 0,52
A1G_02235	ref NC_009882.1_:393787-394791	proteína VirB11	11,02 ± 0,55
A1G_02240	ref NC_009882.1_:394925-396700	proteína VirD4	11,08 ± 0,86
A1G_02285	ref NC_009882.1_:402739-403515	proteína cysQ	14,17 ± 0,86
A1G_02360	ref NC_009882.1_:418652-418861	proteína hipotética A1G_02360	13,04 ± 0,63
A1G_02385	ref NC_009882.1_:c421714-421487	proteína hipotética A1G_02385	13,7 ± 0,48
A1G_02435	ref NC_009882.1_:c431296-429542	proteína AprD (<i>alkaline protease secretion ATP-binding</i>)	15,72 ± 0,96
A1G_02675	ref NC_009882.1_:c473994-471502	proteína de membrana de ligação	14,98 ± 0,61
A1G_02785	ref NC_009882.1_:487702-488622	recombinase XerD tirosina sítio-específica	12,35 ± 0,66
A1G_02865	ref NC_009882.1_:500770-502338	lisil-tRNA sintetase	15,34 ± 0,81
A1G_02955	ref NC_009882.1_:513850-514026	proteína contendo domínios repetidos de anquirina 2	12,36 ± 0,49
A1G_02960	ref NC_009882.1_:514056-514307	proteína contendo domínios repetidos de anquirina 3	12,09 ± 0,62
A1G_03005	ref NC_009882.1_:525229-525366	proteína hipotética A1G_03005	15,97 ± 0,98
A1G_03155	ref NC_009882.1_:555321-555569	proteína hipotética A1G_03155	13,38 ± 0,58
A1G_03300	ref NC_009882.1_:577205-579712	leucil-tRNA sintetase	15,95 ± 1,27
A1G_03445	ref NC_009882.1_:600281-600448	proteína hipotética A1G_03445	14,39 ± 0,54

Nota: A análise transcricional foi realizada por RT- qPCR microfluídica.

Tabela 14 (Continuação).

Identificação do gene	CDS	Anotação	Média de Ct ± SD
A1G_03490	ref NC_009882.1_:608404-609831	succinato semialdeído desidrogenase	12,72 ± 0,79
A1G_03540	ref NC_009882.1_:616905-619217	protease La ATP-dependente	15,88 ± 1,19
A1G_03570	ref NC_009882.1_:621997-621737	proteína hipotética A1G_03570	15,14 ± 0,83
A1G_03790	ref NC_009882.1_:652833-655895	antígeno de superfície	11,95 ± 0,55
A1G_03930	ref NC_009882.1_:676576-677049	fator de iniciação da tradução IF-3	10,77 ± 0,46
A1G_04200	ref NC_009882.1_:720461-719856	subunidade proteolítica da protease Clp ATP-dependente	12,53 ± 0,87
A1G_04750	ref NC_009882.1_:803667-803269	proteína FtsL de divisão celular	14,01 ± 0,68
A1G_04850	ref NC_009882.1_:815948-815700	proteína contendo domínios repetidos de anquirina 4	14,60 ± 0,79
A1G_04855	ref NC_009882.1_:819688-816968	componente A da via de secreção de proteína dependente de Sec	12,51 ± 0,57
A1G_04915	ref NC_009882.1_:830629-830507	proteína hipotética A1G_04915	13,50 ± 0,58
A1G_04930	ref NC_009882.1_:832062-832241	proteína hipotética A1G_04930	10,50 ± 0,50
A1G_04935	ref NC_009882.1_:832252-832677	preproteína translocase subunidade YajC	9,43 ± 0,48
A1G_04940	ref NC_009882.1_:832661-834217	componente D da via de secreção de proteína dependente de Sec	11,41 ± 0,56
A1G_05085	ref NC_009882.1_:859725-861197	precursor b1 de patatin	8,78 ± 0,46
A1G_05165	ref NC_009882.1_:871627-869777	proteína hipotética A1G_05165	13,88 ± 0,75
A1G_05210	ref NC_009882.1_:881085-879286	proteína reguladora de nitrogênio NtrY	12,84 ± 0,63
A1G_05315	ref NC_009882.1_:901984-901727	chaperonina GroEL	13,31 ± 0,77
A1G_05455	ref NC_009882.1_:922200-920899	preproteína translocase subunidade Y	15,69 ± 0,95
A1G_05810	ref NC_009882.1_:968241-966715	metionil tRNA sintetase	10,71 ± 0,58
A1G_05960	ref NC_009882.1_:991314-992378	proteína de resistência a biciclicomicina	16,28 ± 1,12
A1G_06030	ref NC_009882.1_:1007464-1002500	proteína de superfície externa B (ompB)	11,05 ± 1,06
A1G_06045	ref NC_009882.1_:1009998-1009702	proteína hipotética A1G_06045	13,84 ± 0,64
A1G_06100	ref NC_009882.1_:1020437-1020736	proteína hipotética A1G_06100	15,71 ± 0,64
A1G_06145	ref NC_009882.1_:1025600-1025133	ribonuclease H	10,16 ± 0,70
A1G_06350	ref NC_009882.1_:1051294-1051470	proteína hipotética A1G_06350	11,37 ± 0,50
A1G_06440	ref NC_009882.1_:1061923-1061801	proteína hipotética A1G_06440	16,65 ± 1,23
A1G_06670	ref NC_009882.1_:1107497-1109929	proteína precursora de VirB4	12,43 ± 0,61
A1G_06745	ref NC_009882.1_:1127890-1127534	proteína hipotética A1G_06745	11,41 ± 0,72
A1G_06915	ref NC_009882.1_:1153524-1153240	antígeno-like de superfície Sca13	16,67 ± 0,83
A1G_07055	ref NC_009882.1_:1181808-1181458	ferredoxina	12,30 ± 0,85
A1G_07170	ref NC_009882.1_:1203242-1201938	citrato sintase tipo II	11,37 ± 0,53
A1G_07355	ref NC_009882.1_:1234383-1234144	antitoxina do sistema StbD toxina-antitoxina	15,59 ± 0,93
A1G_07375	ref NC_009882.1_:1236834-1237097	proteína J induzida por danos no DNA	15,71 ± 0,48
A1G_07480	ref NC_009882.1_:1250262-1250714	proteína hipotética A1G_07480	12,80 ± 0,52
Rrlowa_1080	ref NC_010263.2_:856717-858162	proteína RickA de ativação do complexo Arp2/3	10,96 ± 0,50

5 DISCUSSÃO

Rickettsia rickettsii, o agente etiológico da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (*Rock Mountain Spotted Fever*, RMSF) é uma α -proteobactéria intracelular obrigatória, transmitida ao homem por diferentes espécies de carrapatos (Dantas Torres et al., 2012). Na região metropolitana da cidade de São Paulo, o carrapato *Amblyomma aureolatum*, que infesta cães domésticos e, portanto, apresenta grande proximidade com o homem, é um importante vetor (Labruna, 2009; Labruna et al., 2011; Pinter, Labruna, 2006; Vieira et al., 2004). Além de atuar como vetor de *R. rickettsii*, o carrapato *A. aureolatum* possui ainda um alto potencial de reservatório da bactéria, uma vez que, experimentos de infecção experimental demonstraram que 100% dos carrapatos de uma colônia mantida em laboratório tornam-se infectados (Labruna et al., 2008; Labruna et al., 2011).

Mesmo apresentando antibioticoterapia (tetraciclina e cloranfenicol) como alternativa terapêutica, a RMSF ainda é a mais letal das riquetsioses que acometem o homem, e suas taxas de letalidade no estado de São Paulo podem ultrapassar os 50% <http://www.cve.saude.sp.gov.br/bepa/pdf/BEPA94_SUPLEMENTO_FMB.pdf>. A prevenção da doença, até o momento, baseia-se exclusivamente no controle das populações de carrapatos que transmitem a bactéria e na prevenção da exposição de humanos às áreas infestadas por esses carrapatos. Uma alternativa de profilaxia seria o desenvolvimento de uma vacina. Para isso, o conhecimento dos mecanismos moleculares da interação entre a bactéria e seus vetores é fundamental, podendo levar à identificação de potenciais alvos vacinais.

Como a regulação ao nível da transcrição desempenha um papel fundamental em procariotos, a determinação da expressão gênica de um patógeno durante a infecção do vetor ou do hospedeiro pode fornecer informações importantes sobre a relação patógeno-hospedeiro e, dessa forma, vem sendo empregada para o estudo de uma grande diversidade de agentes etiológicos (La et al., 2007; Raoult et al., 2008). Além disso, estes estudos podem permitir a identificação de potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas que impeçam a transmissão da bactéria pelo carrapato vetor para um vertebrado previamente vacinado. Esta estratégia foi previamente adotada, por exemplo, para o desenvolvimento da vacina LYMERix™, que se baseia no bloqueio da transmissão da bactéria *Borrelia burgdorferi*, agente

etiológico da doença de Lyme, para pessoas previamente vacinadas (Sigal et al., 1998).

O genoma completo da cepa virulenta Sheila Smith de *R. rickettsii* (GenBank CP000848.1) foi elucidado em 2008 por Ellison e colaboradores, tornando possível a utilização de metodologias de análise de expressão gênica em larga escala, tais como microarranjos, para o estudo funcional dos genes desta bactéria. Os microarranjos vêm sendo amplamente utilizados para a detecção de alterações na expressão gênica de bactérias (Kazmierczak et al., 2003; Ng et al., 2003), incluindo riquetsias (Audia et al., 2008; Dreher-Lesnick et al., 2008; Ellison et al., 2008; Ellison et al., 2009; La et al., 2007). Através da utilização desta metodologia, nós investigamos os efeitos de dois estímulos ambientais sobre o perfil de expressão gênica global de *R. rickettsii* infectando carrapatos *A. aureolatum*: (i) a elevação da temperatura em 10 °C e (ii) a exposição aos fatores da refeição sanguínea adquirida pelo vetor. *R. rickettsii* é naturalmente exposta a esses dois estímulos quando o carrapato infectado em jejum, livre no ambiente, encontra seu hospedeiro vertebrado, fixa-se à sua pele aquecida e inicia a alimentação sanguínea. Ambos foram previamente associados à reativação da virulência desta bactéria em carrapatos (Gilford, Price, 1955; Hayes, Burgdorfer, 1982; Policastro et al., 1997; Spencer, Parker, 1923). Porém, os fatores responsáveis pela conversão do fenótipo virulento em avirulento não foram completamente elucidados até o momento.

Inicialmente, customizamos os microarranjos de oligonucleotídeos com base no genoma completo da cepa virulenta Sheila Smith de *R. rickettsii*, a única cepa com genoma completo disponível nos bancos de dados públicos na fase da customização. Atualmente, diversas cepas de *R. rickettsii* tiveram seus genomas disponibilizados no GeneBank, incluindo uma denominada *Brazilian*. Entretanto, nenhuma informação relacionada à sua origem ou qualquer característica biológica (por exemplo, virulência) foi apresentada. Na comparação genômica da cepa Sheila Smith com a cepa avirulenta Iowa, 143 deleções e 492 polimorfismos de base única (SNPs) foram identificados (Ellison et al., 2008). Dentre os SNPs, 339 localizam-se em fase aberta de leitura (*open reading frames*, ORFs), mas apenas 188 SNPs resultam em substituições de aminoácidos não sinônimas (Ellison et al., 2008). Ainda neste estudo, somente quatro genes foram diferencialmente expressos quando o RNA das cepas virulentas Sheila Smith e R foram hibridizados em microarranjos da própria cepa Sheila Smith e também da cepa Iowa. Assim, estes

resultados indicam que as diferenças genômicas entre cepas não alteram sua expressão gênica (Ellison et al., 2008).

Para a padronização dos procedimentos de preparação e marcação de amostras para a hibridização com os microarranjos, buscamos, primeiramente, uma forma de obter grandes quantidades de RNA de *R. rickettsii*. Para isso, uma linhagem de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BME26) mantida em cultivo foram infectadas com a cepa Taiaçu de *R. rickettsii*. A propagação de microorganismos, incluindo os intracelulares obrigatórios, em diferentes linhagens de células de carrapatos *in vitro* já foi descrita na literatura, como, por exemplo, o cultivo de bactérias dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* (para revisão, veja Bell-Sakyi et al., 2007). O cultivo *in vitro* de bactérias do gênero *Rickettsia* em células de carrapato também já foi previamente reportado, como, por exemplo, o cultivo de *R. felis* em células embrionárias de *I. scapularis* (ISE6) (Pornwiroon et al., 2006) e de *R. raoultii* em células embrionárias de *Dermacentor reticulatus* (Alberdi et al., 2012). Contudo, a infecção *in vitro* de *R. rickettsii*, em particular, tem sido bem pouco explorada e pouco descrita na literatura (Ellison et al., 2009). Uma das linhagens celulares de carrapato bem descrita na literatura é a BME26, a qual foi caracterizada celular e molecularmente por Esteves e colaboradores (2008). Nessas células, a adesão de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) (Kurtti, 1993) e a propagação de *Anaplasma marginale* (Esteves et al., 2009) foram reportadas. A cepa Taiaçu de *R. rickettsii* foi capaz de infectar as células BME26 (**Figura 3**) em todas as condições analisadas, incluindo diferentes pHs, temperaturas de incubação e MOI. Essa é a primeira vez que uma cepa brasileira de *R. rickettsii* foi estabelecida em células de carrapato mantidas *in vitro*. A curva de crescimento bacteriano nas células BME26 foi determinada por qPCR com a sonda TaqMan[®] específica para o gene da citrato sintase (*gltA*) de *Rickettsia* spp (**Figura 4**). Observamos que a quantidade de bactérias aumenta em uma ordem de grandeza a cada 18 h, sendo que após 60 h do início da infecção ocorre o descolamento da maior parte das células da monocamada. A curva de crescimento de *R. rickettsii* e o efeito citopático da infecção sobre as células BME26 foram semelhantes ao previamente observado em outros cultivos celulares (Policastro et al., 1997). Com a curva de crescimento, pudemos observar que as bactérias, nessas condições, se encontravam em fase log de crescimento 48 h após a adição do inóculo ao cultivo celular.

Após a obtenção de RNA de *R. rickettsii* na fase log de crescimento em células BME26, prosseguimos com a padronização dos procedimentos de preparação de amostras para os experimentos de microarranjo. Os resultados da padronização mostraram que enquanto a amplificação do cDNA nas amostras era um passo fundamental para a obtenção de sinais satisfatórios de fluorescência, a remoção do RNAm eucariótico não era (**Figura 2**). De fato, o processo de amplificação linear global do RNA, como descrito na literatura (Kang et al., 2011; La et al., 2007; Lawson, Johnston, 2006), é um processo fundamental para obtenção de dados transcricionais de alta qualidade. Além disso, um melhor sinal de fluorescência foi obtido com o kit de marcação Genomic DNA ULS™ Labeling (Agilent Technologies) (**Figura 5**). Esse resultado deve-se ao fato de que, nesse processo, o acoplamento dos corantes Cy3 e Cy5 ao ácido nucleico independe da presença de um nucleotídeo modificado o que é um pré-requisito para a marcação com o FairPaly III Labeling Kit.

Com os procedimentos para os experimentos de microarranjos padronizados, seguimos para as análises da expressão gênica global de *R. rickettsii* infectando órgãos de fêmeas adultas de *A. aureolatum*. Este corresponde ao primeiro relato da expressão gênica global de *R. rickettsii* infectando um carrapato-vetor natural. Nossos resultados demonstraram que ambos os estímulos ambientais favoreceram o crescimento de *R. rickettsii*, uma vez que diferenças significativas foram observadas na carga bacteriana em carrapatos não alimentados incubados a 25 °C em comparação com carrapatos não alimentados e incubados a 35 °C ou alimentados (**Figura 6**). Além disso, a elevação da temperatura e a alimentação sanguínea modularam de maneira expressiva o perfil transcricional global de *R. rickettsii*. Entretanto, a influência da alimentação sanguínea sobre o perfil transcricional da bactéria foi maior se comparado à elevação de temperatura, modulando cinco vezes mais genes (**Tabelas 2 a 4 e Anexos C a E**). Esse efeito maior deflagrado pela alimentação pode estar associado à maior oferta de nutrientes. De fato, a indução de genes que estão diretamente relacionados com produção e conversão de energia (oito genes) além de replicação, recombinação e reparo (oito genes) foi deflagrada apenas pela exposição à alimentação.

Por outro lado, a elevação de 10 °C de temperatura estimulou de maneira mais discreta a expressão gênica global da bactéria, reprimindo genes relacionados ao metabolismo e transporte de carboidrato (i), nucleotídeos (ii) e lipídeos (iii) além de

genes relacionados a produção e conversão de energia (iv) e replicação, recombinação e reparo. Embora *R. rickettsii* tenha reagido transcricionalmente à elevação da temperatura, o aumento em 10 °C não provocou uma resposta característica de choque térmico. As análises globais identificaram a indução de apenas uma proteína de choque térmico (GrpE) e de uma proteína de choque frio (A1G_05630). Esses dados indicam que a elevação da temperatura em 10 °C possa ser encarado como um desafio natural para *R. rickettsii*. De fato, um estudo prévio dos efeitos de variações da temperatura de incubação (de 22 °C para 37 °C em células de carrapato em cultivo ou de 25 °C para 34 °C em células Vero) mostrou uma discreta modulação gênica de *R. rickettsii*. Uma modulação significativa (56 genes) foi detectada apenas quando as células foram expostas a uma variação de 30 °C (Ellison et al., 2009). Proteínas de choque térmico como GroES, GroEL e DnaK foram reprimidas quando a bactéria foi exposta a um decréscimo de 30 °C. Diferentemente, um discreto decréscimo de temperatura (de 37 °C a 25 °C) ocasionou a repressão de diversos genes de *R. typhi* infectando células Vero, incluindo genes codificadores de chaperonas e proteínas de choque térmico (Dreher-Lesnick et al., 2008).

Além de genes possivelmente associados à multiplicação bacteriana, a alimentação sanguínea promoveu a modulação de um conjunto de genes associado a tráfego intracelular e secreção, incluindo componentes do sistema de secreção tipo IV (T4SS). Esse sistema é caracterizado por um complexo proteico ancorado na membrana da bactéria e que permite o transporte de macromoléculas, conhecidas como efetores, para a célula hospedeira. Os efetores interagem com proteínas da célula hospedeira, auxiliando a sobrevivência intracelular da bactéria (Voth et al., 2012). Esse sistema de secreção, bem como seus efetores, tem sido estudado em outros membros da ordem Rickettsiales como *Anaplasma phagocytophilum* e *Ehrlichia chaffeensis* (Rikihisa, Lin, 2010), além de *Coxiella burnetii* (Chen et al., 2010). Nossos dados de transcrição global demonstraram que a alimentação sanguínea modulou significativamente quase a totalidade dos genes que codificam os componentes do T4SS de *R. rickettsii*. A expressão de *virB3*, *virB8* e *virB11* foi estatisticamente validada por RT-qPCR. Esses dados indicam que a secreção de efetores por esse sistema bacteriano pode ser importante durante a aquisição da alimentação sanguínea pelo vetor. Entretanto, enquanto houve a indução de *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11*, e *virD4* pelo estímulo, a expressão de *virB3* foi reprimida. Esse

perfil pode ser justificado pela diferente localização desse componente no cromossomo de *R. rickettsii* (**Figura 14**), indicando que, provavelmente, esse gene seja controlado por um mecanismo regulatório diferente. Duas proteínas hipotéticas (A1G_00820 e A1G_00825) localizadas a jusante de *virB3* também foram reprimidas. Ambas as proteínas hipotéticas contêm domínios da proteína VirB6 (**Tabela 7**). A presença de duas cópias de VirB6 em *R. rickettsii* confirma análises anteriores de componentes do T4SS de outras espécies de bactérias do gênero *Rickettsia* (Gillespie et al., 2009). Além disso, outra proteína hipotética (A1G_01380) que foi induzida pela alimentação sanguínea possui domínios da proteína VirB2 (**Tabela 6**). Interessantemente, essa é a primeira descrição deste componente do sistema em *R. rickettsii*, considerado ausente anteriormente (Gillespie et al., 2009).

Figura 14 - Localização e orientação dos genes codificadores de componentes do T4SS reprimidos (A) ou induzidos (B) pela alimentação sanguínea no cromossomo de *R. rickettsii*.

Nota: As setas pretas representam genes cuja modulação foi observada nas duas réplicas biológicas analisadas e as setas cinzas representam os genes cuja modulação foi observada em apenas uma das réplicas. A modulação da ATPase VirB4 (A1G_00815, seta branca) não foi observada.

Diferentemente do observado em *R. rickettsii*, a expressão gênica de componentes do T4SS de *R. conorii* foi induzida pela depleção de nutrientes durante a infecção de células Vero (La et al., 2007). Sob o mesmo aspecto de depleção nutricional, Ellison e colaboradores (2009) estudaram a influência de componentes do sangue na expressão gênica global de *R. rickettsii* durante a infecção *in vitro* de células Vero e de uma linhagem de células embrionárias do carrapato *Ixodes scapularis* (ISE6). Neste trabalho, foi avaliado o perfil transcricional da bactéria quando um agente quelante de ferro, com atividade inibitória sobre o crescimento de patógenos intracelulares, foi adicionado ao meio de cultura. Foi detectada uma

alteração no crescimento bacteriano e a modulação de apenas cinco genes com *fold-change* ≥ 3.0 . Como esses genes codificam proteínas hipotéticas, os autores não concluíram a relação entre o estímulo ambiental e a modulação da expressão dos mesmos.

Recentemente, reações em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-qPCR) em circuitos microfluídicos vêm sendo utilizadas a fim de analisar, em larga escala, perfis de expressão de múltiplos genes e múltiplas amostras simultaneamente. Um exemplo é a plataforma conhecida como Biomark *high-throughput* RT-qPCR (Fluidigm Corporation), a qual se baseia em uma análise simultânea de até 96 amostras contra até 96 pares de oligonucleotídeos. Essa metodologia também é aplicada para análises de transcrição de uma única célula (Citri et al., 2011) e para a análise da expressão de micro RNAs (Jang et al., 2011). Além disso, é utilizada em análises genômicas, tais como busca por mutações e estabelecimento de assinaturas gênicas (Patel et al., 2012; Rosa et al., 2012). Utilizando essa plataforma, analisamos o perfil de expressão de todos os componentes do T4SS nas glândulas salivares e nos intestinos de fêmeas e machos adultos. Os componentes VirB4, VirB8, VirB9, VirB10, VirB11 e VirD4 foram induzidos em ambos os tecidos de ambos os gêneros (**Tabela 11**). Esse resultado sugere que a secreção de efetores da célula bacteriana para as células do intestino dos carrapatos seja promovida pela alimentação, permitindo a invasão dessa primeira barreira físico-química e assegurando o sucesso da colonização. Além disso, esses genes também fazem parte da assinatura transcricional da bactéria em intestinos de carrapatos alimentados (**Figura 12**). O uso de assinaturas gênicas tem sido relatada, principalmente em estudos humanos, a fim de se estabelecerem padrões para alvos terapêuticos (Patel et al., 2012; Shi et al., 2012), perfis de diagnóstico (Johansson et al., 2011) e até definição de prognósticos (Kumar et al., 2013; Peterson, 2013). Um único estudo para a definição de uma assinatura gênica foi reportado para bactérias do gênero *Rickettsia* (Renesto et al., 2008). Nesse trabalho, uma assinatura de *Rickettsia conorii* infectando a pele de humanos diagnosticados com a Febre Maculosa do Mediterrâneo foi definida, o qual auxiliou a identificação de novas características da patogenia pele-específica. Assim, a identificação das assinaturas específicas de *R. rickettsii* em intestinos e glândulas salivares de carrapatos poderão não somente auxiliar o entendimento das interações

tecido-específicas, como também podem direcionar os futuros estudos funcionais para identificação de possíveis alvos de bloqueio da infecção.

Também avaliamos algumas das moléculas que conhecidamente atuam como efetores do T4SS de bactérias. Essas proteínas, que contêm domínios eucarióticos repetidos de anquirina (sendo por isso conhecida como Anks) estão envolvidas na interação proteína-proteína. Em algumas bactérias intracelulares, já foi demonstrado que as proteínas Anks secretadas no citoplasma da célula hospedeira onde interagem com proteínas do próprio hospedeiro (Habyarimana et al., 2008; Lin et al., 2007; Pan et al., 2008; Park et al., 2004; Rikihisa, Lin, 2010). Na célula hospedeira, podem desempenhar diferentes funções, tais como regulação de ciclo celular e transcrição gênica, interação de citoesqueleto, desenvolvimento celular e tráfego intracelular (Bork, 1993; Mosavi et al., 2004; Pan et al., 2008; Sedgwick & Smerdon, 1999; para revisão ver Voth, 2011). Uma das proteínas com domínios de ankirina mais descritas em bactérias intracelulares é a AnkA de *Anaplasma phagocytophilum*. Ela é responsável pela modulação da transcrição gênica da célula eucariota, já que interage com regiões específicas da cromatina do hospedeiro (Caturegli et al., 2000; Garcia-Garcia et al., 2009; Ijdo et al., 2007; Lin et al., 2007; Park et al., 2004). Nossos resultados de microarranjos mostraram que apenas duas CDS (A1G_02840 e A1G_04305), que codificam proteínas com domínios repetidos de anquirinas, foram reprimidas pela alimentação sanguínea. Esse resultado sugere que esses prováveis efetores de *R. rickettsii* atuem em outros órgãos dos carrapatos ou ainda que desempenhem funções apenas em células do hospedeiro vertebrado.

Em virtude da sua importância como efetores do sistema T4SS, analisamos o perfil de outras seis proteínas Anks previamente anotadas no genoma de *R. rickettsii* em glândulas salivares e intestinos de *A. aureolatum* por RT-qPCR microfluídica. Observamos que a alimentação sanguínea não modula as CDS dessas Anks em nenhum dos tecidos e gêneros testados. Por outro lado, três delas (A1G_00070, A1G_01255, A1G_02955) foram significativamente induzidas em glândulas salivares de machos e de fêmeas expostos à elevação da temperatura. As glândulas salivares são um importante sítio de interação entre o carrapato vetor, o hospedeiro vertebrado e o patógeno, uma vez que a saliva produzida nesse órgão é inoculada no hospedeiro vertebrado e pode carrear o patógeno (Nuttall, Labuda, 2003; vide **Figura 1**). Assim, esses dados de modulação sugerem que estas três proteínas Anks podem estar envolvidas na interação com moléculas do hospedeiro vertebrado,

propiciando a invasão. Entretanto, futuros estudos funcionais são necessários para esclarecer suas interações com T4SS e seus papéis durante a infecção do carrapato-vetor.

Ainda sob efeito da alimentação sanguínea, observamos a indução de três enzimas antioxidantes (tioredoxina peroxidase 1, glutaredoxina 3 e ferredoxina) e uma proteína hipotética com domínio de tioredoxina (A1G_00185) (**Tabela 3 e Anexo D**). A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS) em artrópodes hematófagos é consequência da degradação da hemoglobina e liberação do heme (para revisão ver Graça-Souza et al., 2006). Além disso, a produção de ROS e NOS, corresponde a uma defesa imune contra infecções, descrita em todo o reino animal (para revisão ver Dzik, 2010). De fato, já foi reportado que os hemócitos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* produzem ROS quando estimulados por bactérias (Pereira et al., 2001). Dentre os efeitos danosos de ROS, destacam-se a capacidade de oxidar DNA, lipídeos e proteínas, interferindo, assim, nas suas funções fisiológicas (Stroher, Millar, 2012). Estudos também sugerem que o DNA bacteriano seja o alvo primário de ROS quando a concentração de ferro livre está elevada no meio (Park et al., 2005). Dessa maneira, é provável que *R. rickettsii* encontre-se sob estresse oxidativo em carrapatos, tanto em decorrência da resposta imune quanto em decorrência da exposição à alimentação sanguínea. Como os sistemas glutaredoxina (Grx) e tioredoxina (Trx) estão envolvidos na recuperação do proteoma celular ao estado normal após ou durante condições desfavoráveis do ambiente (Stroher, Millar, 2012), é provável que a indução da tioredoxina peroxidase 1 e da glutaredoxina 3 reflita em a tentativa de *R. rickettsii* de se proteger dos efeitos deletérios dos radicais livres em carrapatos alimentados. Assim, esses dados podem ser um indicativo de que esse estresse culmina em uma resposta antioxidativa da bactéria.

Os nossos estudos de transcrição global e tecido-específico demonstram que em *R. rickettsii* a aquisição de sangue reprimiu significativamente três genes codificadores do antígeno de superfície celular (Sca) 8, um gene codificador de Sca10 e outro codificador de Sca13. Em bactérias, proteínas de superfície celular estão envolvidas na interação célula-célula, além de estarem associadas à evasão do sistema imune por modificações estruturais ou ainda à antigenicidade ligada ao sistema imune adaptativo de mamíferos (Erova et al., 2013; Futse et al., 2005; Ojogun et al., 2012; Raja, Natarajaseenivasan, 2013; Walker, 1996). Dessa forma, o

estudo dessas proteínas pode ser chave para a descoberta de possíveis alvos de bloqueio da infecção. O perfil transcricional de proteínas de superfície de *B. burgdorferi*, já foi descrito como modulado quando associado à presença de sangue em culturas *in vitro* (Tokarz et al., 2004). Nesse estudo, os genes codificadores da proteína de superfície C (OspC) e da protease Lon, enzima possivelmente relacionada ao remodelamento das proteínas de superfície desta bactéria, foram induzidos. O grupo de proteínas Sca (antígeno de superfície celular) incluem duas importantes proteínas de superfície rOmpA (Sca0) e rOmpB (Sca5) de bactérias do gênero *Rickettsia* (para revisão ver Blanc et al., 2005). Essas duas proteínas foram previamente relacionadas à adesão e/ou invasão de células de mamíferos (Hillman et al., 2013; Li, Walker, 1998; Uchiyama et al., 2006). Além disso, rOmpA já foi estudada como potencial antígeno vacinal (McDonald et al., 1987; McDonald et al., 1988). Ainda associada à invasão de células hospedeiras, a interação de rOmpB com Ku-70, uma proteína do hospedeiro de 70 kDa, foi identificada durante a infecção de *R. conorii* em células Vero (Chan et al., 2009; Martinez et al., 2005).

Nas nossas análises de microarranjo, observamos que rOmpA e rOmpB não foram moduladas por nenhum dos dois estímulos ambientais analisados em órgão totais de fêmeas adultas. Entretanto, quando avaliamos a expressão desses dois genes nas glândulas salivares e intestinos de machos e fêmeas por RT-qPCR microfluídica, identificamos que a elevação de temperatura induziu significativamente a expressão de rOmpA nas glândulas salivares dos carrapatos enquanto rOmpB foi induzida nos intestinos dos carrapatos pela alimentação. Assim, é provável que da mesma maneira que rOmpA esteja associada a interação com moléculas da superfície células do hospedeiro vertebrado, rOmpB possa estar envolvida na interação e invasão do intestino do carrapato-vetor.

Além dos estudos dos efeitos isolados da elevação da temperatura e da alimentação sanguínea sob o perfil transcricional de *R. rickettsii*, avaliamos os efeitos aditivos desses dois estímulos ambientais nas glândulas salivares e intestinos de *A. aureolatum* machos e fêmeas, por RT-qPCR microfluídica. De fato, quando carrapatos infectados no ambiente encontram um hospedeiro vertebrado e iniciam o processo de alimentação, *R. rickettsii* é simultaneamente exposta à elevação da temperatura e componentes do sangue. Interessantemente, identificamos que os efeitos aditivos dos dois estímulos sobre o perfil transcricional de *R. rickettsii* são similares aos efeitos do efeito da alimentação sanguínea

isoladamente. Importantes fatores de virulência, como os componentes do T4SS (VirB4, VirB8, VirB11 e VirD4), além das enzimas antioxidantes (tioredoxina peroxidase 1 e tioredoxina) também foram induzidas pelos dois estímulos combinados. Estes dados, de maneira geral, reforçam a influência da alimentação sanguínea nos processos de virulência bacteriana, mesmo desencadeando um processo de estresse no microambiente celular.

A transcrição de genes de *R. rickettsii* infectando células BME26 também foi avaliada por RT-qPCR microfluídica. Observamos que todos os genes analisados são expressos *in vitro*, com valores de Ct (*threshold cycle*) próximos aos observados em tecidos de carrapatos (**Tabela 14**). Esse resultado é importante, abrindo a possibilidade do uso de sistemas *in vitro* para o estudo da transcrição gênica, bem como das proteínas produzidas por *R. rickettsii*. De fato, nos últimos anos, sistemas de cultivo de células *in vitro*, principalmente de células de vetores e hospedeiros de microrganismos, têm se mostrado uma ferramenta importante para o estudo da biologia dos parasitas e da relação parasita-hospedeiro (para revisão, veja Bell-Sakyi et al., 2007).

6 CONCLUSÃO

A elevação da temperatura em aproximadamente 10°C e a exposição aos componentes do sangue do hospedeiro vertebrado simulam alguns dos estímulos ambientais aos quais a bactéria *Rickettsia rickettsii* é naturalmente exposta em seu carrapato-vetor. Interessantemente, ambos os estímulos foram previamente associados com a reativação da virulência de *Rickettsia* em carrapatos. Através de análises de expressão gênica, nós demonstramos que os dois estímulos propiciam a proliferação da bactéria em carrapatos, bem como modulam a expressão de conjuntos específicos de genes. No entanto, os componentes do sangue parecem exercer um maior efeito sobre o perfil transcricional de *R. rickettsii*, modulando cinco vezes mais genes que a temperatura. Os efeitos aditivos dos dois estímulos também são muito próximos dos efeitos observados pela alimentação sanguínea somente, reforçando o papel majoritário dos componentes do sangue no remodelamento do perfil de expressão da bactéria.

Os genes modulados que foram identificados neste trabalho, incluindo aqueles codificadores de proteínas hipotéticas, deverão ser funcionalmente caracterizados em futuros trabalhos e podem ser considerados alvos potenciais para o desenvolvimento de uma vacina anti-*R. rickettsii*. Além disso, o cultivo de *R. rickettsii* foi estabelecido com sucesso em um cultivo de células de carrapatos *in vitro*, onde também foi observada a expressão de diversos genes. Esse resultado é importante, abrindo a possibilidade do uso de sistemas *in vitro* para o estudo da transcrição gênica, bem como das proteínas produzidas por *R. rickettsii*.

REFERÊNCIAS*

- Alberdi MP, Nijhof AM, Jongejan F, Bell-Sakyi L. Tick cell culture isolation and growth of *Rickettsia raoultii* from Dutch *Dermacentor reticulatus* ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012 Dec;3(5-6):349-54.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64:5245-50.
- Angerami RN, Resende MR, Feltrin AF, Katz G, Nascimento EM, Stucchi RS, Silva LJ. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil: clinical aspects. *Ann N Y Acad Sci.* 2006a Oct;1078:252-4.
- Angerami RN, Resende MR, Feltrin AF, Katz G, Nascimento EM, Stucchi RS, Silva LJ. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil: epidemiological aspects. *Ann N Y Acad Sci.* 2006b Oct;1078:170-2.
- Audia JP, Patton MC, Winkler HH. DNA microarray analysis of the heat shock transcriptome of the obligate intracytoplasmic pathogen *Rickettsia prowazekii*. 2008 *Appl Environ Microbiol.* 2008 Dec;74(24):7809-12.
- Ballman KV, Grill DE, Oberg AL, Therneau TM. Faster cyclic loess: normalizing RNA 529 arrays via linear models. *Bioinformatics.* 2004;20:2778-86.
- Barker SC, Murrell A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology.* 2004;129 Suppl:S15-36. Review.
- Barragan A, Hitziger N. Transepithelial migration by Toxoplasma. *Subcell. Biochem.* 2008;47:198-207.
- Barros SL, Madruga CR, Araújo FR, Menk CF, de Almeida MA, Melo EP, Kessler RH. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Oct;100(6):513-7.
- Beckwith J. The Sec-dependent pathway. *Res Microbiol.* 2013;164:497-504.
- Belitskaya-Lévy I, Zeleniuch-Jacquotte A, Russo J, Russo IH, Bordás P, Ahman J, Afanasyeva Y, Johansson R, Lenner P, Li X, de Cicco RL, Peri S, Ross E, Russo PA, Santucci-Pereira J, Sherif FS, Slifker M, Hallmans G, Toniolo P, Arslan AA. Characterization of a genomic signature of pregnancy identified in the breast. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011 Sep;4(9):1457-64.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Bell-Sakyi L, Zweygarth E, Blouin EF, Gould EA, Jongejan F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol.* 2007 Sep; 23(9):450-7.

Blanc G, Ngwamidiba M, Ogata H, Fournier PE, Claverie JM. Molecular evolution of rickettsia surface antigens: evidence of positive selection. *Mol Biol Evol.* 2005;22: 2073-83.

Bork P. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins.* 1993 Dec;17(4):363-74.

Böse R, Jorgensen WK, Dalglish RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol.* 1995 Mar;57(1-3):61-74. Review.

Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet.* 2001 Dec;29(4):365-71.

Burgdorfer W. Ecological and epidemiological considerations of Rock Mountain spotted fever and scrub typhus. pp.33-50 in *Biology of Rickettsial Diseases*. 1988 vol.1. (D.H. Walker, ed), CRC Inc, Boca Raton, USA.

Calic SB, Barcellos-Rocha CM, Leite RC, Mafrá CL, Galvão MA. Old and new human rickettsiosis in Minas Gerais state, Brazil. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1063:356-7.

Cardoso LD, Freitas RN, Mafrá CL, Neves CV, Figueira FC, Labruna MB, Gennari SM, Walker DH, Galvão MA. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2006 Mar;22(3):495-501.

Caturegli P, Asanovich KM, Walls JJ, Bakken JS, Madigan JE, Popov VL, Dumler JS. ankA: an *Ehrlichia phagocytophila* group gene encoding a cytoplasmic protein antigen with ankyrin repeats. *Infect Immun.* 2000 Sep;68(9):5277-83.

Ceraul SM, Dreher-Lesnick SM, Gillespie JJ, Rahman MS, Azad AF. New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. *Infect. Immun.* 2007 75:1973-83.

Chan YG, Cardwell MM, Hermanas TM, Uchiyama T, Martinez JJ. Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiol.* 2009;11:629-44.

Chapman, AS, Murphy SM. "Rocky mountain spotted fever in the United States, 1997-2002." *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1078:154-5.

Chen C, Banga S, Mertens K, Weber MM, Gorbaslieva I. Large-scale identification and translocation of type IV secretion substrates by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 21755-60.

Citri A, Pang ZP, Südhof TC, Wernig M, Malenka RC. Comprehensive qPCR profiling of gene expression in single neuronal cells. *Nat Protoc.* 2011 Dec 22;7(1):118-27.

Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. *Vet Parasitol.* 2011 Nov 24;182(1):14-21.

Concepcion MB, Nelson DR. Expression of *spoT* in *Borrelia burgdorferi* during serum starvation. *J Bacteriol.* 2003 Jan;185(2):444-52.

Conway T, Schoolnik GK. Microarray expression profiling: capturing a genome wide portrait of the transcriptome. *Mol. Microbiol.* 2003 47:879-89.

Dantas-Torres F. "Rocky Mountain spotted fever." *Lancet Infect Dis.* 2007 7(11): 724-32.

Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* 2012 Oct;28(10):437-46.

de la Fuente J, Blouin EF, Manzano-Roman R, Naranjo V, Almazán C, Pérez de la Lastra JM, Zivkovic Z, Jongejan F, Kocan KM. Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. *Genomics.* 2007 Dec;90(6):712-22.

de Lemos ER, Alvarenga FB, Cintra ML, Ramos MC, Paddock CD, Ferebee TL, Zaki SR, Ferreira FC, Ravagnani RC, Machado RD, Guimarães MA, Coura JR. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Oct;65(4):329-34.

Demma LJ, Traeger MS, Nicholson WL, Paddock CD, Blau DM, Eremeeva ME, Dasch GA, Levin ML, Singleton J Jr, Zaki SR, Cheek JE, Swerdlow DL, McQuiston JH. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353:587-94.

Dobler G. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Vet Microbiol.* 2010 Jan 27;140(3-4):221-8. Review.

Dreher-Lesnick SM, Ceraul SM, Rahman MS, Azad AF. Genome-wide screen for temperature-regulated genes of the obligate intracellular bacterium, *Rickettsia typhi*. *BMC Microbiol.* 2008;8:61.

Dzik JM. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim Pol.* 2010;57:443-66.

Ehrenreich A. DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;73(2):255-73.

Ellison DW, Clark TR, Sturdevant DE, Virtaneva K, Porcella SF, Hackstadt T. Genomic comparison of virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa. *Infect. Immun.* 2008;76: 542-50.

Ellison DW, Clark TR, Sturdevant DE, Virtaneva K, Hackstadt T. Limited transcriptional responses of *Rickettsia rickettsii* exposed to environmental stimuli. PLoSOne. 2009;4(5): e5612.

Erova TE, Rosenzweig JA, Sha J, Suarez G, Sierra JC, Kirtley ML, van Lier CJ, Telepnev MV, Motin VL, Chopra AK. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine. Clin Vaccine Immunol. 2013 Feb;20(2):227-38.

Esteves E, Lara FA, Lorenzini DM, Costa GH, Fukuzawa AH, Pressinotti LN, Silva JR, Ferro JA, Kurtti TJ, Munderloh UG, Daffre S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Insect Biochem Mol Biol. 2008 May;38(5):568-80.

Esteves E, Fogaça AC, Maldonado R, Silva FD, Manso PP, Pelajo-Machado M, Valle D, Daffre S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. Dev Comp Immunol. 2009 Aug; 33(8):913-9.

Estrada-Peña A, Guglielmone AA, Mangold AJ. The distribution and ecological 'preferences' of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. Ann Trop Med Parasitol. 2004 Apr;98(3):283-92.

Estripeaut D, Aramburu MG. "Rocky Mountain spotted fever, Panama." Emerg Infect Dis 2007;13(11):1763-5.

Foley JE, Brown RN, Gabriel MW, Henn J, Drazenovich N, Kasten R, Green SL, Chomel BB. Spatial analysis of the exposure of dogs in rural north-coastal California to vector-borne pathogens. Vet Rec. 2007;161(19):653-7.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Wathley L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature. 1997 Dec 11;390(6660):580-6.

Fritzen CM, Huang J, Westby K, Freye JD, Dunlap B, Yabsley MJ, Schardein M, Dunn JR, Jones TF, Moncayo AC. Infection prevalences of common tick-borne pathogens in adult lone star ticks (*Amblyomma americanum*) and American dog ticks (*Dermacentor variabilis*) in Kentucky. Am J Trop Med Hyg. 2011 Oct;85(4):718-23.

Fuentes LG. 1st case of Rocky Mountain fever in Costa Rica. Central America. Rev Latinoam Microbiol. 1979 Oct-Dec;21(4):167-72.

Futse JE, Brayton KA, Knowles DP Jr, Palmer GH. Structural basis for segmental gene conversion in generation of *Anaplasma marginale* outer membrane protein variants. Mol Microbiol. 2005 Jul;57(1):212-21.

Garcia-Garcia JC, Rennoll-Bankert KE, Pelly S, Milstone AM, Dumler JS. Silencing of host cell CYBB gene expression by the nuclear effector Anka of the intracellular pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect Immun*. 2009 Jun;77(6):2385-91.

Garduño RA, Garduño E, Hiltz M, Hoffman PS. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun*. 2002 Nov;70(11):6273-83.

Gilford JH, Price WH. Virulent-avirulent conversion of *Rickettsia rickettsii* *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1955;41: 870-3.

Gillespie JJ, Ammerman NC, Dreher-Lesnick SM, Rahman MS, Worley MJ. An anomalous type IV secretion system in *Rickettsia* is evolutionarily conserved. *PLoS One* 2009;4: e4833.

Graca-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GR, Paes MC. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol* 2006;36:322-35.

Greene CE, Breitschwerdt EB. Rocky Mountain spotted fever, murine typhuslike disease, rickettsialpox, typhus, and Q fever. In: Greene C, editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. 2006 3rd ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier; p. 232-45.

Guedes E, Leite R, Prata MCA, Pacheco RC, Walker DH, Labruna MB. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Mem. Instit. Oswaldo Cruz*. 2005 100: 841-8.

Habyarimana F, Al-Khodori S, Kalia A, Graham JE, Price CT, Garcia MT, Kwaik YA. Role for the Ankyrin eukaryotic-like genes of *Legionella pneumophila* in parasitism of protozoan hosts and human macrophages. *Environ Microbiol*. 2008 Jun;10(6):1460-74.

Hackstadt T. The biology of rickettsiae. *Infect Agents Dis*. 1996 Jun;5(3):127-43. Review.

Hajdušek O, Síma R, Ayllón N, Jalovecká M, Perner J, de la Fuente J, Kopáček P. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Jul 16;3:26.

Han Y, Zhou D, Pang X, Song Y, Zhang L, Bao J, Tong Z, Wang J, Guo Z, Zhai J, Du Z, Wang X, Zhang X, Wang J, Huang P, Yang R. Microarray analysis of temperature-induced transcriptome of *Yersinia pestis*. *Microbiol. Immunol*. 2004 48: 791-805.

Hayes SF, Burgdorfer W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* ticks: an ultrastructural analysis. *Infect Immun*. 1982 Aug;37(2):779-85.

Heinzen RA, Hayes SF, Peacock MG, Hackstadt T. Directional actin polymerization associated with spotted fever group *Rickettsia* infection of Vero cells. *Infect Immun* 1993;61: 1926-35.

Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 1993;62: 349-84.

Hidalgo M, Orejuela L. "Rocky Mountain spotted fever, Colombia." *Emerg Infect Dis* 2007 13(7):1058-60.

Hillman RD Jr, Baktash YM, Martinez JJ. OmpA-mediated rickettsial adherence to and invasion of human endothelial cells is dependent upon interaction with integrin. *Cell Microbiol*. 2013 May;15(5):727-41.

Holman PJ, Ronald NC. A new tick cell line derived from *Boophilus microplus*. *Res Vet Sci*. 1980 Nov;29(3):383-7.

Horak IG, Camicas JL, Keirans JE. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp Appl Acarol*. 2002 28(1-4):27-54.

Hughes TR, Shoemaker DD. DNA microarrays for expression profiling. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 2001;5:21-5.

Hun L, Cortés X, Taylor L. Molecular characterization of *Rickettsia rickettsii* isolated from human clinical samples and from the rabbit tick *Haemaphysalis leporispalustris* collected at different geographic zones in Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Dec;79(6):899-902.

IJdo JW, Carlson AC, Kennedy EL. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA is tyrosine-phosphorylated at EPIYA motifs and recruits SHP-1 during early infection. *Cell Microbiol*. 2007 May;9(5):1284-96.

Jang JS, Simon VA, Feddersen RM, Rakhshan F, Schultz DA, Zschunke MA, Lingle WL, Kolbert CP, Jen J. Quantitative miRNA expression analysis using fluidigm microfluidics dynamic arrays. *BMC Genomics*. 2011 Mar 9;12:144.

Johns RH, Sonenshine DE, Hynes WL. Enhancement of OspC expression by *Borrelia burgdorferi* in the presence of tick hemolymph. *FEMS Microbiol Lett*. 2000 Dec 1;193(1):137-41.

Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004;129 Suppl:S3-14.

Kang MJ, Yu H, Kim SK, Park SR, Yang I. Quantification of trace-level DNA by real-time whole genome amplification. *PLoS One*. 2011;6(12):e28661.

Karim S, Browning R, Ali L, Truhett R. Laboratory-infected *Ehrlichia chaffeensis* female adult *Amblyomma americanum* salivary glands reveal differential gene expression. *J Med Entomol*. 2012 May;49(3):547-54.

Kazmierczak MJ, Mithoe SC, Boor KJ, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. *J Bacteriol*. 2003 Oct;185(19):5722-34.

Keirans JE, Durden LA. Invasion: exotic ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) imported into the United States. A review and new records. J Med Entomol. 2001 Nov;38(6):850-61.

Kilpatrick AM, Randolph SE. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. Lancet. 2012 Dec 1;380(9857):1946-55.

Klompen JS, Black WC 4th, Keirans JE, Oliver JH Jr. Evolution of ticks. Annu Rev Entomol. 1996 ;41:141-61. Review.

Kreil DP, Russell RR, Russell S. Microarray oligonucleotide probes. Methods Enzymol. 2006 410: 73-98. Review.

Kumar P, Dezso Z, Mackenzie C, Oestreicher J, Agoulnik S, Byrne M, Bernier F, Yanagimachi M, Aoshima K, Oda Y. Circulating miRNA Biomarkers for Alzheimer's Disease. PLoSOne. 2013 Jul 29;8(7):e69807.

Kurtti TJ, Munderloh UG, Krueger DE, Johnson RC, Schwan TG. Adhesion to and invasion of cultured tick (Acarina: Ixodidae) cells by *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and maintenance of infectivity. J Med Entomol. 1993 May;30(3):586-96.

La MV, François P, Rovey C, Robineau S, Barbry P, Schrenzel J, Raoult D, Renesto P. Development of a method for recovering rickettsial RNA from infected cells to analyze gene expression profiling of obligate intracellular bacteria. J Microbiol Methods. 2007 71(3):292-7.

Labruna MB, Horta MC, Aguiar DM, Cavalcante GT, Pinter A, Gennari SM, Camargo LMA. Prevalence of Rickettsia infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, western Amazon, Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis 2007 7: 249-55.

Labruna MB, Ogrzewalska M, Martins TF, Pinter A, Horta MC. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. Journal of Medical Entomology. 2008 45(6): 1156-9.

Labruna MB. Ecology of rickettsia in South America. Ann N Y Acad Sci. 2009 May;1166:156-66.

Labruna MB, Ogrzewalska M, Soares JF, Martins TF, Soares HS, Moraes-Filho J, Nieri-Bastos FA, Almeida AP, Pinter A. Experimental Infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. Emerging Infectious Diseases. 2011 17 (5): 829-34.

Lasala PR, Holbrook M. Tick-borne flaviviruses. Clin Lab Med. 2010 Mar;30(1):221-35.

Latif AA, Putterill JF, de Klerk DG, Pienaar R, Mans BJ. *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae): first description of the male, immature stages and re-description of the female. PLoSOne 2012 7(7):e41651.

Lawson JN, Johnston SA. Amplification of sense-stranded prokaryotic RNA. *DNA Cell Biol.* 2006 Nov;25(11):627-34.

Leroy Q, Raoult D. Review of microarray studies for host-intracellular pathogen interactions. *J. Microb Methods* 2010;81(2):81-95.

Li H, Walker DH. rOmpA is a critical protein for the adhesion of *Rickettsia rickettsii* to host cells. *Microb Pathog* 1998;24:289-98.

Lin M, den Dulk-Ras A, Hooykaas PJ, Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. *Cell Microbiol.* 2007 Nov;9(11):2644-57.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 2001;25: 402-408.

Lucchini S, Thompson A, Hinton JC. Microarrays for microbiologists. *Microbiology.* 2001 Jun;147(6):1403-14.

Macaluso KR, Mulenga A, Simser JA, Azad AF. Differential expression of genes in uninfected and rickettsia-infected *Dermacentor variabilis* ticks as assessed by differential-display PCR. *Infect. Immun.* 2003;71:6165-70.

Macaluso KR, Mulenga A, Simser JA, Azad AF. Characterization of *Dermacentor variabilis* molecules associated with rickettsial infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1078: 384-88.

Mans BJ, Neitz AW. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004 Jan;34(1):1-17. Review.

Mans BJ, de Klerk D, Pienaar R, de Castro MH, Latif AA. The mitochondrial genomes of *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae) and *Argas africanus* (Ixodidae: Argasidae): estimation of divergence dates for the major tick lineages and reconstruction of ancestral blood-feeding characters. *PLoSOne* 2012 7(11):e49461.

Martinez JJ, Seveau S, Veiga E, Matsuyama S, Cossart P. Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. *Cell.* 2005 Dec 16;123(6):1013-23.

McDade JE, Newhouse VF. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Annu Rev Microbiol.* 1986;40:287-309.

McDonald GA, Anacker RL, Garjian K. Cloned gene of *Rickettsia rickettsii* surface antigen: candidate vaccine for Rocky Mountain spotted fever. *Science.* 1987 Jan 2;235(4784):83-5.

McDonald GA, Anacker RL, Mann RE, Milch LJ. Protection of guinea pigs from experimental Rocky Mountain spotted fever with a cloned antigen of *Rickettsia rickettsii*. *J Infect Dis.* 1988 Jul;158(1):228-31.

McNally KL, Mitzel DN, Anderson JM, Ribeiro JM, Valenzuela JG, Myers TG, Godinez A, Wolfenbarger JB, Best SM, Bloom ME. Differential salivary gland transcript expression profile in *Ixodes scapularis* nymphs upon feeding or flavivirus infection. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012 Feb;3(1):18-26.

Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 2004 13: 1435-48.

Mulenga A, Macaluso KR, Simser JA, Azad AF. Dynamics of Rickettsia-tick interactions: identification and characterization of differentially expressed mRNAs in uninfected and infected *Dermacentor variabilis*. *Insect Mol. Biol.* 2003;12:185-93.

Munderloh UG, Jauron SD, Fingerle V, Leitritz L, Hayes SF, Hautman JM, Nelson CM, Huberty BW, Kurti TJ, Ahlstrand GG, Greig B, Mellencamp MA, Goodman JL. Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture. *J Clin Microbiol.* 1999 Aug;37(8):2518-24.

Narasimhan S, Santiago F, Koski RA, Brei B, Anderson JF, Fish D, Fikrig E. Examination of the *Borrelia burgdorferi* transcriptome in *Ixodes scapularis* during feeding. *J Bacteriol.* 2002 Jun;184(11):3122-5.

Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci* 2009 Jan 1;14:2857-77. Review.

Nene V, Lee D, Kang'a S, Skilton R, Shah T, de Villiers E, Mwaura S, Taylor D, Quackenbush J, Bishop R. Genes transcribed in the salivary glands of female *Rhipicephalus appendiculatus* ticks infected with *Theileria parva*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004 Oct;34(10):1117-28.

Ng SK, Tan SH, Sundararajan VS. On combining multiple microarray studies for improved functional classification by whole-dataset feature selection. *Genome Inform.* 2003;14:44-53.

Nicholson WL, Allen K E. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology* 2010;26(4): 205-12.

Niebylski ML, Peacock MG, Schwan ETG. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). *App. Environm. Microbiol.* 1999;65:773-338.

Nuttall PA, Labuda M. Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface. *Adv Virus Res.* 2003;60:233-72. Review.

Ogrzewalska M, Saraiva DG, Moraes-Filho J, Martins TF, Costa FB, Pinter A, Labruna MB. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Parasitology.* 2012 Sep;139(10):1283-300.

Ojaimi C, Brooks C, Casjens S, Rosa P, Elias A, Barbour A, Jasinskas A, Benach J, Katona L, Radolf J, Caimano M, Skare J, Swingle K, Akins D, Schwartz I. Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays. *Infect. Immun.* 200;71:1689-1705.

Ojogun N, Kahlon A, Ragland SA, Troese MJ, Mastronunzio JE, Walker NJ, Viebrock L, Thomas RJ, Borjesson DL, Fikrig E, Carlyon JA. *Anaplasma phagocytophilum* outer membrane protein A interacts with sialylated glycoproteins to promote infection of mammalian host cells. *Infect Immun*. 2012 Nov;80(11):3748-60.

Paddock CD, Fernandez S, Echenique GA, Sumner JW, Reeves WK, Zaki SR, Remondégui CE. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Apr;78(4):687-92.

Pan X, Luhrmann A, Satoh A, Laskowski-Arce MA, Roy CR Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science*. 2008;320: 1651- 4.

Park J, Kim KJ, Choi KS, Grab DJ, Dumler JS. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA binds to granulocyte DNA and nuclear proteins. *Cell Microbiol*. 2004 Aug;6(8):743-51.

Park S, You X, Imlay JA Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 102: 9317-9322.

Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev*. 2005;18: 719-56.

Parola P, Raoult D. Tropical rickettsioses. *Clin Dermatol*. 2006 May-Jun;24(3):191-200. Review.

Pashalidis S, Moreira LM, Zaini PA, Campanharo JC, Alves LM, L. Ciapina P, R. Vêncio RZ, Lemos EG, da Silva AM, da Silva AC. Whole-genome expression profiling of *Xylella fastidiosa* in response to growth on glucose. *Omics*. 2005;9: 77-90.

Patel R, Tsan A, Tam R, Desai R, Schoenbrunner N. Mutation Scanning Using MUT-MAP, a High-Throughput, Microfluidic Chip-Based, Multi- Analyte Panel. *PLoSOne*. 2012 7(12): e51153.

Pereira LS, Oliveira PL, Barja-Fidalgo C, Daffre S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Parasitol*. 2001;99: 66-72.

Peterson DR. Constructing multivariate prognostic gene signatures with censored survival data. *Methods Mol Biol*. 2013;972:85-101.

Piesman J, Eisen L. Prevention of tick-borne diseases. *Annu Rev Entomol*. 2008;53:323-43.

Piesman J, Zeidner NS, Schneider BS. Dynamic changes in *Borrelia burgdorferi* populations in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) during transmission: studies at the mRNA level. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2003 Fall;3(3):125-32.

Pinter A, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1078: 523-9.

Policastro PF, Munderloh UG, Fischer ER, Hackstadt T. *Rickettsia rickettsii* growth and temperature-inducible protein expression in embryonic tick cell lines. J. Med. Microbiol. 1997;46: 839-45.

Pornwiroon W, Pourciau SS, Foil LD, Macaluso KR. *Rickettsia felis* from cat fleas: isolation and culture in a tick-derived cell line. Appl Environ Microbiol. 2006 Aug; 72(8):5589-95.

Rahman MS, Gillespie JJ, Kaur SJ, Sears KT, Ceraul SM. *Rickettsia typhi* Possesses Phospholipase A2 Enzymes that Are Involved in Infection of Host Cells. PLoS Pathog. 2013;9: e1003399.

Rahman MS, Simser JA, Macaluso KR, Azad AF. Functional analysis of secA homologues from rickettsiae. Microbiology. 2005;151: 589-96.

Raja V, Natarajaseenivasan K. Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs). Crit Rev Microbiol. 2013 May 21.

Renesto P, Rovey C, Schrenzel J, Leroy Q, Huyghe A, Li W, Lepidi H, François P, Raoult D. *Rickettsia conorii* transcriptional response within inoculation eschar. PLoS One. 2008;3(11):e3681.

Reynolds MA, Chaves SS, Harpaz R, Seward JF. The impact of the varicella vaccination program on herpes zoster epidemiology in the United States: a review. J. Infect. Dis 2008;1:S224-7.

Rikihisa Y, Lin M. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* type IV secretion and Ank proteins. Curr Opin Microbiol. 2010;13: 59-66.

Ripoll CM, Remondegui CE, Ordonez G, Arazamendi R, Fusaro H, Hyman MJ, Paddock CD, Zaki SR, Olson JG, Santos-Buch CA. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. Am J Trop Med Hyg. 1999 Aug;61(2):350-4.

Rosa RD, de Lorgeril J, Tailliez P, Bruno R, Piquemal D, Bachère E. A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. BMC Genomics. 2012 Jun 18;13:252.

Rovey C, Renesto P, Crapoulet N, Matsumoto K, Parola P, Ogata H, Raoult D. Transcriptional response of *Rickettsia conorii* exposed to temperature variation and stress starvation. Res. Microbiol. 2005 156: 211-18.

Rozen S, Skaletsky H Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol. 2000;132: 365-86.

Rudenko N, Golovchenko M, Edwards MJ, Grubhoffer L. Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. J Med Entomol. 2005 Jan;42(1):36-41.

Sangioni LA, Horta MC, Vianna MCB, Gennari SM, Soares RS, Galvão MAM, Schumaker TTS, Ferreira F, Vidotto O, Labruna MB. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. Emerging Infect. Dis. 2005;11: 265-70.

Schnittger L, Rodriguez AE, Florin-Christensen M, Morrison DA. Babesia: a world emerging. Infect Genet Evol. 2012 Dec;12(8):1788-809. Review.

Schoolnik GK. Functional and comparative genomics of pathogenic bacteria. Curr. Op. Microbiol. 2002;5: 20-6.

Schulze A & Downward J. Navigating gene expression using microarrays - a technology review. Nature Cell Biol. 2001;3: E190-5.

Sedgwick SG, Smerdon SJ. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. Trends Biochem Sci. 1999 Aug;24(8):311-6. Review.

Shi M, Beauchamp RD, Zhang B. A network-based gene expression signature informs prognosis and treatment for colorectal cancer patients. PLoSOne. 2012 7(7):e41292.

Sigal LH, Zahradnik JM, Lavin P, Patella SJ, Bryant G, Haselby R, Hilton E, Kunkel M, Adler-Klein D, Doherty T, Evans J, Molloy PJ, Seidner AL, Sabetta JR, Simon HJ, Klempner MS, Mays J, Marks D, Malawista SE. A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. Recombinant Outer-Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium. N Engl J Med. 1998 Jul 23;339(4):216-22.

Soares JF, Soares HS, Barbieri AM, Labruna MB. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. Med Vet Entomol. 2012 Jun; 26(2):139-51.

Souza CE, Moraes-Filho J, Ogrzewalska M, Uchoa FC, Horta MC, Souza SS, Borba RC, Labruna MB. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. Vet Parasitol. 2009 Apr 6;161(1-2):116-21.

Spencer RR, Parker RR. Rocky Mountain spotted fever: infectivity of fasting and recently fed ticks. Public Health Reports. 1923;38: 333-9.

Stevenson B, von Lackum K, Riley SP, Cooley AE, Woodman ME, Bykowski T. Evolving models of Lyme disease spirochete gene regulation. Wien Klin Wochenschr. 2006 Nov;118(21-22):643-52. Review.

Stewart GR, Wernisch L, Stabler R, Mangan JA, Hinds J, Laing KG, Young DB, Butcher PD. Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. Microbiology. 2002 148(10):3129-3138.

Stroher E, Millar AH. The biological roles of glutaredoxins. Biochem J. 2012;446: 333-48.

Suarez CE, Noh S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. Vet Parasitol. 2011 Aug 4;180(1-2):109-25.

Sunyakumthorn P, Petchampai N, Kearney MT, Sonenshine DE, Macaluso KR. Molecular characterization and tissue-specific gene expression of *Dermacentor variabilis* α -catenin in response to rickettsial infection. *Insect Mol Biol*. 2012 Apr;21(2):197-204.

Szabó MP, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Jul 12;3:27.

Tokarz R, Anderton JM, Katona LI, Benach JL. Combined effects of blood and temperature shift on *Borrelia burgdorferi* gene expression as determined by whole genome DNA Array. *Infect. Immun*. 2004;72:5419-32.

Uchiyama T. Tropism and pathogenicity of rickettsiae. *Front Microbiol*. 2012;3: 230.

Uchiyama T, Kawano H, Kusuhara Y. The major outer membrane protein rOmpB of spotted fever group rickettsiae functions in the rickettsial adherence to and invasion of Vero cells. *Microbes Infect*. 2006;8:801-9.

van der Veen S, Hain T, Wouters JA, Hossain H, de Vos WM, Abee T, Chakraborty T, Wells-Bennik MH. The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response. *Microbiology*. 2007;153(10):3593-607.

Vieira AML, Souza C E, Labruna MB, Mayo R C, Souza SSL, Camargo-Neves VLF. Manual de Vigilância Acarológica, Estado de São Paulo. Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, Brasil. 2004;62pp.

Voth DE. ThANKs for the repeat: Intracellular pathogens exploit a common eukaryotic domain. *Cell Logist*. 2011;1: 128-132.

Voth DE, Broderdorf LJ, Graham JG. Bacterial 570 Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future Microbiol*. 2012;7:241-57.

Walker DH, Feng HM, Popov VL. Rickettsial phospholipase A2 as a pathogenic mechanism in a model of cell injury by typhus and spotted fever group rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:936-42.

Walker, DH. Rocky Mountain spotted fever: a disease in need of microbiological concern. *Clin. Microbiol. Rev*. 1989;2(3): 227-40.

Walker DH. Rickettsiae. n: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. 1996 Chapter 38.

Weiss E. The biology of rickettsiae. *Annu Rev Microbiol*. 1982;36:345-70. Review.

Wike DA, Burgdorfer W. Plaque formation in tissue cultures by *Rickettsia rickettsi* isolated directly from whole blood and tick hemolymph. *Infect Immun*. 1972 Nov;6(5):736-8.

Winkler HH. Rickettsial permeability. An ADP-ATP transport system. *J Biol Chem*. 1976;251: 389-96.

Winkler HH. *Rickettsia* species (as organisms). Annu Rev Microbiol. 1990;44:131-53.

Wolbach SB. Studies on Rocky Mountain spotted Fever. J Med Res. 1919 Nov;41(1):1-198.41.

Zaini PA, Fogaça AC, Lupo FG, Nakaya HI, Vêncio RZ, da Silva AM. The iron stimulon of *Xylella fastidiosa* includes genes for type IV pilus and colicin V-like bacteriocins. J Bacteriol. 2008;190(7):2368-78.

Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Walker DH, Ruiz Arcila EE, Laviada-Molina H, Olano JP, Ruiz-Sosa JA, Small MA, Dzul-Rosado KR. Fatal human infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, Mexico. Emerg Infect Dis. 2006 Apr;12(4):672-4.

Zivkovic Z, Blouin EF, Manzano-Roman R, Almazán C, Naranjo V, Massung RF, Jongejan F, Kocan KM, de la Fuente J. *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma marginale* elicit different gene expression responses in cultured tick cells. Comp Funct Genomics. 2009;705034.

Zivkovic Z, Esteves E, Almazán C, Daffre S, Nijhof AM, Kocan KM, Jongejan F, de la Fuente J. Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale*. BMC Genomics. 2010 Mar 18;11:186.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Oligonucleotídeos utilizados na validação dos dados de expressão gênica de *R. rickettsii* obtidos nos microarranjos.

CDS	Gene alvo	Oligonucleotídeo senso	Oligonucleotídeo antissenso
ref NC_009882.1_652833-655895	Antígeno de superfície	TAACCAACCACTGCAACCTG	TTGCATGCTGCCTGATAAAG
ref NC_009882.1_c1249026-1247194	Proteína de reparo e emparelhamento de DNA	CCTTACTGCGTCAAATGGAAA	CGTCCAAATAAGCGTTCGAT
ref NC_009882.1_1250262-1250714	Proteína hipotética A1G_07480	TTGGAGAAGTAGGTGATTTTGG	TGGTAAACTCCGCTACCTTTTT
ref NC_009882.1_991314-992378	Proteína de resistência a bicilomicina	GGGATATCATCGGTTGCAG	AGGGCAATAGTGCCGTTTA
ref NC_009882.1_487702-488622	Recombinase XerD tirosina sítio específico	CGCGTTTAATCCGGTTCTTA	TTGAGAGCAATGTTCAAGTAACG
ref NC_009882.1_c944176-943964	Proteína like de choque térmico	TTTGTACACAAATCAGCCGTAGA	CAGCATAGGCTTTTCCTTGC
ref NC_009882.1_524000-524968	Proteína hipotética A1G_03000	GCTTGGTGAATCGACCTTATT	GATAAAGGCGTATTTGCCTCA
ref NC_009882.1_45976-46317	Antígeno- <i>like</i> de superfície Sca10	CCGGGACTACATGCTTCTGT	TGCTGCTAATTGTAGTGTCTCAA
ref NC_009882.1_c901984-901727	Chaperonina GroEL	TTTTGGAGCCATCCATTACC	GGTCGGCGACTATCCATATCT
ref NC_009882.1_134020-134307	Proteína VirB3 do sistema de secreção tipo IV	CGCCGATGATATTTGGAGTAA	CAAAGCAGCTGCAATGAATAA
ref NC_009882.1_c269892-269554	Ferredoxina	CACCGGGGTTAATAGAATGG	ATTTATCGGCATCAGGCAAA
ref NC_009882.1_275087-275395	Glutarredoxina 3	AATATGCATGTTGGCGGTTG	CAGCAGGTGCAGTCGTCTT
ref NC_009882.1_c390274-389576	Proteína virB8	ACTTTTGAATCACTGGCAAAAA	GGCATATCAGGTGATGTATTGG
ref NC_009882.1_392342-393790	Proteína virB10	CGCCGGTCTTACCTCCTACT	TGCATCGCTCTCAACTAACG
ref NC_009882.1_393787-394791	Proteína virB11	GAGGCCTGTTTGCCTTTAAG	TGAACCGGGATGACCTGTAT
ref NC_009882.1_1051294-1051470	Proteína hipotética A1G_06350	GCAAGGTGCAGGTCAAGAT	AGTTAGCTGAGCTGTGAGGACA

APÊNDICE B - Oligonucleotídeos utilizados na validação dos dados de expressão gênica de *R. rickettsii* obtidos nos microarranjos.

CDS	Gene alvo	Oligonucleotídeo senso	Oligonucleotídeo antissenso
ref NC_009882.1_:c373645-373484	Proteína de superfície externa A (ompA)	AGATTTTCGGTACGTGGGCTA GGTACGTGGGCTAGTCCTTTT	CCGACAGTACTGCTGGTTGA CCGACAGTACTGCTGGTTGA
ref NC_009882.1_:c1007464-1002500	Proteína de superfície externa B (ompB)	TGGTGCAGGATTACAAGGAA GAACACATGCTGCCGAGTTA	AGTAGTACCGCCGCCTAAAA CCGACAAGAGCAGTTTGGTT
ref NC_009882.1_:c819688-816968	Componente A da via de secreção de proteína dependente de Sec	AAACGCCAAATTTTCATGAGC	TACCCCGTCCTGCCATATTA
ref NC_009882.1_:97701-98159	Componente B da via de secreção de proteína dependente de Sec	CCGCATATTTCCGTTAATGC	ATCAATTTGAGGGCGTTGAT
ref NC_009882.1_:832661-834217	Componente D da via de secreção de proteína dependente de Sec	ATCTGCGTTTGCCACTATCC	CAACGGCAAAACCTTTGATT
ref NC_009882.1_:177150-177350	Componente E da via de secreção de proteína dependente de Sec	TGTTGCTTCAACGTTAGTAGTGG	GCCGATATTAAGCAAAAGCTG
ref NC_009882.1_:156281-157207	Preproteína translocase subunidade F	GGGGCTATGGCGATGTTATT	GTCATGCACTAAGGCATCA
ref NC_009882.1_:c922200-920899	Preproteína translocase subunidade Y	AATTTATGGAGGCGAAGCAA	ATTAGCAAGCGTAGCAGGAAA
ref NC_009882.1_:262509-262940	Antígeno-like de superfície Sca8	GCTCCTGTACTTAACGGTGCT	TGCTCGTTACGTCCTGTTTC
ref NC_009882.1_:45976-46317	Antígeno-like de superfície Sca10	CCGGGACTACATGCTTCTGT	TGCTGCTAATTGTAGTGTCTCAA
ref NC_009882.1_:c1153524-1153240	Antígeno-like de superfície Sca13	GCAGTACTTCAAAGTGGGTGAT	TCCTTAAATTTTATGTCGCCAAC
ref NC_009882.1_:134020-134307	Proteína VirB3 componente do sistema de secreção tipo IV	GGTTAACTAGACCGCCGATG CGCCGATGATATTTGGAGTAA	TCATAATGCCGTTATTCCAAA CAAAGCAGCTGCAATGAATAA
ref NC_009882.1_:394925-396700	Proteína VirD4 componente do sistema de secreção tipo IV	TCCGCCTATAAAATCGCGTA AGATGCAAGCTGGGCTAATC	TGCCCTAGGGTCAAAAGGTA GAACCCGTCTGCAACAAAT
ref NC_009882.1_:c390274-389576	Proteína VirB8 componente do sistema de secreção tipo IV	ACTTTTGAATCACTGGCAAAAA ATCCGGCGAATATTTTATTGA	GGCATATCAGGTGATGTATTGG TCGTGCATATTAAAGCAGAAGA
ref NC_009882.1_:391686-392159	Proteína precursora VirB9 componente do sistema de secreção tipo IV	TGCATTTTGGCTTTCAATCA TTAGTTTTCATTTTGGCTTTC	TGCCAAAGGAGTTATTTTCCA TTTGCCAAAGGAGTTATTTTCC
ref NC_009882.1_:392342-393790	Proteína VirB10 componente do sistema de secreção tipo IV	CGCCGGTCTTACCTCCTACT CCGGCTTTAATATAGGGCTTG	TGCATCGTCTCAACTAACG CAATTGTTTTGCCGTAGCAC
ref NC_009882.1_:393787-394791	Proteína ATPase VirB11 do sistema de secreção tipo IV	GAGGCCTGTTTGCCTTTAAG CGCTCAATCTACCGAACAGA	TGAACCGGGATGACCTGTAT CCTATCTCACAAGCAGGAGGA
ref NC_009882.1_:1107497-1109929	Proteína precursora VirB4 componente do sistema de secreção tipo IV	TACTGCGAACCGAGAAAGG ACATGGCATTACCTCAGAGAAA	AATACGGTTTTGCCGGTTT TGTAGCCAAAAAGCAAAATCA
ref NC_009882.1_:c968241-966715	Metionil tRNA sintetase	GCGTTTTTCATGCCGTCTATT	AATTTTCTGCCCATCATTCTG
ref NC_009882.1_:575078-576217	Subunidade beta da DNA polimerase III	GGCAACGCAAAAGAGGTTA	TCCAAATATTGCGGGTTAAA
ref NC_010263.2_:c856717-858162	Proteína RickA de ativação do complexo Arp2/3	GGAAAATCAACCACGTCTTTC	TGCAACCGGTTTTCTGTAT
ref NC_009882.1_:1028222-1028911	Subunidade epsilon da DNA polimerase III	ACAACAAGGTCATCGAATCGT	AGCCTCAAACGGCATATCTC

APÊNDICE B - Continuação.

CDS	Gene alvo	Oligonucleotídeo senso	Oligonucleotídeo antissenso
ref NC_009882.1 .832252-832677	Preproteína translocase subunidade YajC	GTGCCCTGCAGAAACAAATTCT	TCGTGTTTCTTGTTGGACGTAA
ref NC_009882.1 .859725-861197	Precursor b1 de patatin	CGATTTTACTGGAGGGACCA	TTGCGCTGCACTGAATAAAG
ref NC_009882.1 .c248307-246424	Chaperona molecular DnaK	ATTGAAACTCTTGGCGGTGT	TTACGGCATGCTGGTTATCA
ref NC_009882.1 .c1181808-1181458	Ferredoxina	CACCGGGGTTAATAGAATGG	ATTTATCGGCATCAGGCAAA
ref NC_009882.1 .275087-275395	Glutarredoxina 3	AATATGCATGTTGGCGGTTG	CAGCAGGTGCAGTCGTCTT
ref NC_009882.1 .c450224-449622	Tiorredoxina peroxidase 1	ATTTGTCGGCAAACTGCTC	TATCCCCTGCAGCATAATTG
ref NC_009882.1 .361975-362622	Proteína B exportadora de heme	TGGAAGACGGAAGCTTAGAGT	AACAAAACCAGCCCTATCG
ref NC_009882.1 .c901984-901727	Chaperonina GroEL	TTTTGGAGCCATCCATTACC	GGTCGGCGACTATCCATATCT
ref NC_009882.1 .c944176-943964	Proteína de choque térmico- <i>like</i>	TTTGACACAAATCAGCCGTAGA	CAGCATAGGCTTTTCCTTGC
ref NC_009882.1 .652833-655895	Antígeno de superfície	TAACCAACCACTGCAACCTG	TTGCATGCTGCCTGATAAAG
ref NC_009882.1 .c803667-803269	Proteína FtsL de divisão celular	ACTTTTGCCGGCTAGATTGG	TATATTTGGCCCTAACGGATCTT
ref NC_009882.1 .c1025600-1025133	Ribonuclease H	GTGCGCCGCTTTTACTACTT	CCCCGTTTGATATTTTACGC
ref NC_009882.1 .79249-81117	Enzima GidA com modificação tRNA uridina 5-carboximetilaminometil	GAAATCGATGCACTTGATGG	TCTAGGTCCCCAACTGCTG
ref NC_009882.1 .c1203242-1201938	Citrato sintase tipo II	ATGGGTTTTGGTCATCGTGT	GTTGTCTAGCTGCCCGAGTT
ref NC_009882.1 .c431296-429542	Proteína AprD (<i>alkaline protease secretion ATP-binding</i>)	CACTTGGTGAAGCTACCGAAT	ATTCCTTCATCATTCCCATTCG
ref NC_009882.1 .577205-579712	Leucil-tRNA sintetase	TGGCAGTACATTTGGCAAGA	CATGGATTTTACCGGAAGGGA
ref NC_009882.1 .500770-502338	Lisil-tRNA sintetase	CCTGAAATGGTGGCACAGTA	GAGCGAAGCTTTGCATTTCAT
ref NC_009882.1 .616905-619217	Protease La ATP-dependente	AAAGCTCCAAATTGCCAGA	ATCCAAAAGTGCCATCTCG
ref NC_009882.1 .402739-403515	Proteína cysQ	TCGATCCTATTGATGGGACA	ATATCAAGCCGATGGTTGG
ref NC_009882.1 .82427-83287	Proteína J do estágio 0 da esporulação	AATTTGCCGCAGTCTATTCAA	TCGGCTATTACTTCTGCATGTTT
ref NC_009882.1 .1082-1399	Tiorredoxina	TGCGGACCGTGTAATATGT	GAAGGAGTGTTAGGATTTTCATCA
ref NC_009882.1 .c676576-677049	Fator IF-3 da iniciação da tradução	ATGCACGGCGTCGTAAATA	TACAGACAGGGGTACAGCA
ref NC_009882.1 .115915-116844	Fator de alongamento Ts	CGGTGCAGGTATGATGGAT	TGCAGCAGCAGCTAAACC
ref NC_009882.1 .1236834-1237097	Proteína J induzida por danos no DNA	AGCAGCTTTAGTGCTTGCTG	GTGGTTCAAACGGCAATG
ref NC_009882.1 .c1234383-1234144	Antitoxina do sistema StbD toxina-antitoxina	GCCAGCTGAATTATATGAGCA	AACCGCTATTGCCTTTTCTT
ref NC_009882.1 .c881085-879286	Proteína ntrY de regulação de nitrogênio	GACGAGAATCCGGGAAAATA	TATTAGCTCAGGCGGGAATC
ref NC_009882.1 .991314-992378	Proteína de resistência a biciclomicina	GGGATATCATCGGTTGCAG	AGGGCAATAGTGCCGTTTA
ref NC_009882.1 .487702-488622	Recombinase XerD tirosina sítio específica	CGCGTTTAATCCGGTTCTTA	TTGAGAGCAATGTTCAAGTAACG
ref NC_009882.1 .c277476-277213	DNA girase subunidade A	GCTGGTTTTACCAACCACTT	GCTATTATGCCGAACCTTGGT
ref NC_009882.1 .c1249026-1247194	Proteína de reparo e emparelhamento de DNA	CCTTACTGCGTCAATGGAAA	CGTCCAAATAAGCGTTTCGAT
ref NC_009882.1 .608404-609831	Succinato semialdeído desidrogenase	CGGCGGTAAAACCTGTTGATA	AGCAACTACCGGACCGAATA

APÊNDICE B - Continuação.

CDS	Gene alvo	Oligonucleotídeo senso	Oligonucleotídeo antissenso
ref NC_009882.1 .c406932-406498	Ribose-5-fosfato isomerase B	TTGATACTCGGAGCAAAAACC	TAGGCGGGTGCTATGTCTG
ref NC_009882.1 .c271743-269956	Chaperona HscA	TCTCAATACTCCGGCACTTTTT	TGCAATTTTCAGGGACTCTCA
ref NC_009882.1 .c272234-271734	Co-chaperona HscB	ATGCCTTAAAGCGTGCTGA	GCTTAATTCTAGCGGCGAAA
ref NC_009882.1 .c232567-232908	Proteína contendo domínios repetidos de anquirina 1	ATGATGCTAGCCGCAGAAAG	AGGGAAGTCATTCCGGTTTT
ref NC_009882.1 .c513850-514026	Proteína contendo domínios repetidos de anquirina 2	CCCAGAAAACAAAAGTACCATACA	CTCTAAAGCAGTATCACCATTCTCA
ref NC_009882.1 .c514056-514307	Proteína contendo domínios repetidos de anquirina 3	GGCAGAGCGGTTAATAAAACA	TTTTAAGCGCTGTAATCTGTCAA
ref NC_009882.1 .c815948-815700	Proteína contendo domínios repetidos de anquirina 4	ATACCTTTGCATGCGGTTG	TGCGTTGATATCAGCACCAT
ref NC_009882.1 .c11968-11702	Proteína contendo domínios repetidos de anquirina 5	TATTAAGCTGCTGCCACCTG	ATCCCTTACCTCGGCAAT
ref NC_009882.1 .c12474-12022	Proteína contendo domínios repetidos de anquirina 6	ATCAATCCGATGAGGATGGT	AGCCTCGTCAGACATCTTGG
ref NC_009882.1 .c214853-212547	Proteína de superfície externa 1 (omp1)	TAGTCGGTACCGGGAACTG	CGCCAAGTGATAACTCACGA
ref NC_009882.1 .c720461-719856	Subunidade proteolítica da protease Clp ATP-dependente	CGAGAAGGGGATGCGTTAT	AGGGTTTCTTGAGCATGGATT
ref NC_009882.1 .c158821-159621	Peptidase sinal 1	AGAGTGGGGGTCTTTTGCTT	CTTTCATAGACCCGGTTGGA
ref NC_009882.1 .c473994-471502	Proteína de membrana de ligação	TAGATGCTTACCTGCCACA	TAGGCGGTAATCCGCAATA
ref NC_009882.1 .c418652-418861	Proteína hipotética A1G_02360	CCGCTTTCTGGGTTGTCA	AGATGGTTTGTGCGTTCGTC
ref NC_009882.1 .c591845-591552	Proteína hipotética A1G_03375	ACTTAAGTTTGCTGGGTGCTAAAA	TGCCCAATGATAAACTGGA
ref NC_009882.1 .c1009998-1009702	Proteína hipotética A1G_06045	ACATCTCTTTCTACCGCTAAATC	ACGCACGTCATCGAGGAAT
ref NC_009882.1 .c31143-30847	Proteína hipotética A1G_00180	TCAGGTACAATGGTAGGTGTCG	GCCGGCAATCATTCTCTATTA
ref NC_009882.1 .c1051294-1051470	Proteína hipotética A1G_06350	GCAAGGTGCAGGTCAAGAT	AGTTAGCTGAGCTGTGAGGACA
ref NC_009882.1 .c421714-421487	Proteína hipotética A1G_02385	CAAAAATCCGGTAAAGCTCCT	TATAGTTGTGCCGTCATCCATA
ref NC_009882.1 .c1127890-1127534	Proteína hipotética A1G_06745	GGGTTCTTGGGTGGATTGT	ACCGATGGCAACACGAAG
ref NC_009882.1 .c524000-524968	Proteína hipotética A1G_03000	GCTTGGTGAATCGACCTTATT	GATAAAGCGTATTTGCCTCA
ref NC_009882.1 .c525229-525366	Proteína hipotética A1G_03005	TCCTAATGATGGGAAGTGCA	AATTAGTGTCGGTAAAGCGGTAA
ref NC_009882.1 .c730245-729259	Proteína hipotética A1G_04280	GGTACAATAACAGGCGGGAAT	CGCGGGAATGACATAAAGA
ref NC_009882.1 .c1250262-1250714	Proteína hipotética A1G_07480	TTGGAGAAGTAGGTGATTTTGG	TGGTAAACTCCGCTACCTTTTT
ref NC_009882.1 .c1020437-1020736	Proteína hipotética A1G_06100	CACAAATGCGTCAGTCAGGT	GTAAAAAGCTTAGGCGCTTCG
ref NC_009882.1 .c871627-869777	Proteína hipotética A1G_05165	TTCTGATGAAGGTACAACCTCTGT	GGCTCCTGAATGACAAGAAAA
ref NC_009882.1 .c1061923-1061801	Proteína hipotética A1G_06440	TGCACGTAAAAATGGGAAAGT	GACAGGGACGATGTCCTAAAA
ref NC_009882.1 .c832062-832241	Proteína hipotética A1G_04930	GTTGGAAGCCAAGTAAGTGGT	CCTTTGATACTTCAAGCTTTGG
ref NC_009882.1 .c312257-312475	Proteína hipotética A1G_01755	AGCGGGAATCCAACAATTA	GTCATTCTCGGAAAGCA
ref NC_009882.1 .c555321-555569	Proteína hipotética A1G_03155	CACTAGAAGTCCGCCTCATT	CCTTCATTAAATTCACCTTGTCC
ref NC_009882.1 .c600281-600448	Proteína hipotética A1G_03445	TAGATTCGCTGGTCGTGGT	TGCTATTCTAGGCTCTTTTCTGA
ref NC_009882.1 .c830629-830507	Proteína hipotética A1G_04915	AGGTGCCGAGCTTTATCTAACC	CACGGTTGCACCTAAAATTACA
ref NC_009882.1 .c621997-621737	Proteína hipotética A1G_03570	CCGCAGAAGCACAAAAATTA	TGCAAAATAGCCCTGCTAATG

APÊNDICE C - Proteínas hipotéticas de *R. rickettsii* moduladas pela mudança de temperatura em 10 °C.

CDS	Anotação	Fold-change	
		Réplica biológica 1	Réplica biológica 2
ref NC_009882.1_:289631-290197	Proteína Hipotética A1G_01610	2,06	2,10
ref NC_009882.1_:293809-293943	Proteína Hipotética A1G_01635	1,75	1,54
ref NC_009882.1_:c346202-345054	Proteína Hipotética A1G_01945	2,26	2,12
ref NC_009882.1_:c485893-485420	Proteína Hipotética A1G_02765	2,29	1,69
ref NC_009882.1_:524000-524968	Proteína Hipotética A1G_03000	3,46	2,38
ref NC_009882.1_:525229-525366	Proteína Hipotética A1G_03005	4,29	2,72
ref NC_009882.1_:526267-526467	Proteína Hipotética A1G_03015	2,11	1,63
ref NC_009882.1_:c535744-534896	Proteína Hipotética A1G_03065	1,99	1,61
ref NC_009882.1_:787589-787804	Proteína Hipotética A1G_04655	1,84	1,94
ref NC_009882.1_:807614-807820	Proteína Hipotética A1G_04775	2,13	1,58
ref NC_009882.1_:875046-875333	Proteína Hipotética A1G_05190	1,81	2,18
ref NC_009882.1_:c875454-875305	Proteína Hipotética A1G_05195	2,99	2,57
ref NC_009882.1_:c947519-946632	Proteína Hipotética A1G_05640	2,23	1,85
ref NC_009882.1_:c1026073-1025600	Proteína Hipotética A1G_06150	1,76	1,85
ref NC_009882.1_:c1193675-1193313	Proteína Hipotética A1G_07135	1,99	1,67
ref NC_009882.1_:c1226140-1225526	Proteína Hipotética A1G_07280	1,72	1,69
ref NC_009882.1_:283121-283303	Proteína Hipotética A1G_01585	-2,24	-1,89
ref NC_009882.1_:c368094-367954	Proteína Hipotética A1G_02080	-1,90	-1,52
ref NC_009882.1_:443651-444028	Proteína Hipotética A1G_02525	-1,83	-1,63
ref NC_009882.1_:489832-490995	Proteína Hipotética A1G_02795	-2,07	-1,92
ref NC_009882.1_:520257-521780	Proteína Hipotética A1G_02985	-2,50	-1,99
ref NC_009882.1_:676096-676425	Proteína Hipotética A1G_03925	-1,70	-1,77
ref NC_009882.1_:691150-691590	Proteína Hipotética A1G_04030	-2,31	-1,84
ref NC_009882.1_:c748277-748155	Proteína Hipotética A1G_04410	-1,95	-1,85
ref NC_009882.1_:c759589-759365	Proteína Hipotética A1G_04500	-2,22	-1,70
ref NC_009882.1_:794728-796473	Proteína Hipotética A1G_04720	-1,72	-2,05
ref NC_009882.1_:c871627-869777	Proteína Hipotética A1G_05165	-2,90	-2,95
ref NC_009882.1_:1020437-1020736	Proteína Hipotética A1G_06100	-2,96	-1,56
ref NC_009882.1_:1115303-1116967	Proteína Hipotética A1G_06690	-2,72	-2,28
ref NC_009882.1_:1250262-1250714	Proteína Hipotética A1G_07480	-3,02	-2,21

Nota: A análise transcricional foi realizada por microarranjo de oligonucleotídeos.

APÊNDICE D - Proteínas hipotéticas de *R. rickettsii* induzidas pela alimentação sanguínea.

CDS	Anotação	Fold-change	
		Réplica biológica 1	Réplica biológica 2
ref NC_009882.1_c32054-31221	Proteína Hipotética A1G_00185	2,13	1,92
ref NC_009882.1_c43779-43210	Proteína Hipotética A1G_00270	1,54	1,85
ref NC_009882.1_c58861-58682	Proteína Hipotética A1G_00400	1,84	1,90
ref NC_009882.1_c96803-95487	Proteína Hipotética A1G_00605	2,76	2,62
ref NC_009882.1_c103121-102387	Proteína Hipotética A1G_00640	1,84	1,81
ref NC_009882.1_c122272-122108	Proteína Hipotética A1G_00715	1,88	2,30
ref NC_009882.1_c122409-123413	Proteína Hipotética A1G_00720	1,53	2,07
ref NC_009882.1_c191555-190416	Proteína Hipotética A1G_01045	1,83	2,15
ref NC_009882.1_c221811-221575	Proteína Hipotética A1G_01195	1,91	2,38
ref NC_009882.1_c245095-244994	Proteína Hipotética A1G_01325	1,99	1,99
ref NC_009882.1_c255227-255586	Proteína Hipotética A1G_01380	2,69	2,73
ref NC_009882.1_c268466-267525	Proteína Hipotética A1G_01485	1,56	1,66
ref NC_009882.1_c269541-268471	Proteína Hipotética A1G_01490	2,16	2,12
ref NC_009882.1_c283121-283303	Proteína Hipotética A1G_01585	1,83	1,91
ref NC_009882.1_c312257-312475	Proteína Hipotética A1G_01755	2,92	2,02
ref NC_009882.1_c390739-390918	Proteína Hipotética A1G_02215	2,05	2,15
ref NC_009882.1_c421714-421487	Proteína Hipotética A1G_02385	3,76	3,45
ref NC_009882.1_c436964-437104	Proteína Hipotética A1G_02475	1,50	1,72
ref NC_009882.1_c551038-550655	Proteína Hipotética A1G_03135	1,68	1,72
ref NC_009882.1_c609991-610131	Proteína Hipotética A1G_03495	1,91	2,71
ref NC_009882.1_c634212-634331	Proteína Hipotética A1G_03675	1,82	2,18
ref NC_009882.1_c741051-740596	Proteína Hipotética A1G_04350	1,59	1,61
ref NC_009882.1_c782754-783182	Proteína Hipotética A1G_04620	2,12	1,70
ref NC_009882.1_c789805-789605	Proteína Hipotética A1G_04675	2,09	1,59
ref NC_009882.1_c790607-790365	Proteína Hipotética A1G_04690	1,88	2,01
ref NC_009882.1_c791063-790797	Proteína Hipotética A1G_04700	2,15	2,31
ref NC_009882.1_c838905-839507	Proteína Hipotética A1G_04970	1,84	1,73
ref NC_009882.1_c889260-889108	Proteína Hipotética A1G_05260	3,23	2,25
ref NC_009882.1_c913327-913094	Proteína Hipotética A1G_05400	1,90	2,36
ref NC_009882.1_c951876-952079	Proteína Hipotética A1G_05665	1,92	1,96
ref NC_009882.1_c994684-996585	Proteína Hipotética A1G_05975	1,61	1,95
ref NC_009882.1_c1051294-1051470	Proteína Hipotética A1G_06350	4,12	3,01
ref NC_009882.1_c1062928-1062575	Proteína Hipotética A1G_06455	2,06	1,61
ref NC_009882.1_c1071820-1071686	Proteína Hipotética A1G_06480	1,88	2,08
ref NC_009882.1_c1072517-1072290	Proteína Hipotética A1G_06485	1,55	1,85
ref NC_009882.1_c1079986-1080216	Proteína Hipotética A1G_06525	2,14	2,08
ref NC_009882.1_c1100886-1103396	Proteína Hipotética A1G_06650	1,75	2,04
ref NC_009882.1_c1127890-1127534	Proteína Hipotética A1G_06745	2,94	2,69
ref NC_009882.1_c1233873-1233787	Proteína Hipotética A1G_07345	1,96	2,10
ref NC_009882.1_c1250262-1250714	Proteína Hipotética A1G_07480	2,41	2,62

Nota: A análise transcricional foi realizada por microarranjo de oligonucleotídeos.

APÊNDICE E - Proteínas hipotéticas de *R. rickettsii* reprimidas pela alimentação sanguínea.

CDS	Anotação	Fold-change	
		Réplica biológica 1	Réplica biológica 2
ref NC_009882.1 .c6316-6077	Proteína Hipotética A1G_00030	-2,39	-2,17
ref NC_009882.1 .13826-14749	Proteína Hipotética A1G_00085	-1,98	-1,68
ref NC_009882.1 .32218-32739	Proteína Hipotética A1G_00190	-2,88	-2,59
ref NC_009882.1 .87774-87914	Proteína Hipotética A1G_00570	-1,64	-1,90
ref NC_009882.1 .c100796-100236	Proteína Hipotética A1G_00630	-2,16	-1,79
ref NC_009882.1 .117318-117707	Proteína Hipotética A1G_00690	-1,85	-2,37
ref NC_009882.1 .137058-140018	Proteína Hipotética A1G_00820	-1,88	-1,78
ref NC_009882.1 .140005-141990	Proteína Hipotética A1G_00825	-1,77	-1,59
ref NC_009882.1 .c199098-196984	Proteína Hipotética A1G_01070	-1,65	-1,69
ref NC_009882.1 .210439-210642	Proteína Hipotética A1G_01135	-1,96	-1,89
ref NC_009882.1 .263542-263811	Proteína Hipotética A1G_01450	-5,74	-5,90
ref NC_009882.1 .c264827-264525	Proteína Hipotética A1G_01455	-4,24	-3,88
ref NC_009882.1 .285406-285849	Proteína Hipotética A1G_01605	-2,76	-2,19
ref NC_009882.1 .289631-290197	Proteína Hipotética A1G_01610	-1,89	-1,69
ref NC_009882.1 .333307-333474	Proteína Hipotética A1G_01880	-2,49	-2,64
ref NC_009882.1 .c333827-333624	Proteína Hipotética A1G_01885	-1,89	-2,03
ref NC_009882.1 .c346202-345054	Proteína Hipotética A1G_01945	-1,87	-1,52
ref NC_009882.1 .384409-384507	Proteína Hipotética A1G_02175	-2,47	-2,76
ref NC_009882.1 .c413519-412539	Proteína Hipotética A1G_02330	-2,91	-2,84
ref NC_009882.1 .c439531-439259	Proteína Hipotética A1G_02495	-2,35	-1,81
ref NC_009882.1 .c462530-461532	Proteína Hipotética A1G_02620	-1,75	-1,67
ref NC_009882.1 .495812-496729	Proteína Hipotética A1G_02820	-1,66	-1,94
ref NC_009882.1 .c498787-498383	Proteína Hipotética A1G_02835	-3,73	-3,82
ref NC_009882.1 .c499229-498807	Proteína Hipotética A1G_02840	-3,30	-2,77
ref NC_009882.1 .524000-524968	Proteína Hipotética A1G_03000	-8,32	-6,07
ref NC_009882.1 .525229-525366	Proteína Hipotética A1G_03005	-8,16	-5,32
ref NC_009882.1 .526267-526467	Proteína Hipotética A1G_03015	-3,53	-2,48
ref NC_009882.1 .c533894-533406	Proteína Hipotética A1G_03050	-3,04	-2,31
ref NC_009882.1 .c535744-534896	Proteína Hipotética A1G_03065	-2,81	-2,05
ref NC_009882.1 .c536134-535754	Proteína Hipotética A1G_03070	-2,20	-1,73
ref NC_009882.1 .c537320-536325	Proteína Hipotética A1G_03075	-3,65	-2,43
ref NC_009882.1 .561253-561429	Proteína Hipotética A1G_03195	-1,54	-1,72
ref NC_009882.1 .726966-727136	Proteína Hipotética A1G_04250	-2,08	-2,15
ref NC_009882.1 .c727231-727037	Proteína Hipotética A1G_04255	-3,02	-2,67
ref NC_009882.1 .c727442-727242	Proteína Hipotética A1G_04260	-4,51	-3,61
ref NC_009882.1 .c727681-727544	Proteína Hipotética A1G_04265	-7,60	-8,08
ref NC_009882.1 .c727818-727639	Proteína Hipotética A1G_04270	-6,03	-7,16
ref NC_009882.1 .c730245-729259	Proteína Hipotética A1G_04280	-7,85	-6,86
ref NC_009882.1 .c733692-733087	Proteína Hipotética A1G_04305	-4,91	-3,82
ref NC_009882.1 .767346-770225	Proteína Hipotética A1G_04555	-1,66	-1,72

Nota: A análise transcricional foi realizada por microarranjo de oligonucleotídeos.

APÊNDICE E – Continuação.

CDS	Anotação	<i>Fold-change</i>	
		Réplica biológica 1	Réplica biológica 2
ref NC_009882.1_:774111-774803	Proteína Hipotética A1G_04585	-3,52	-3,13
ref NC_009882.1_:c814522-814355	Proteína Hipotética A1G_04840	-2,08	-1,74
ref NC_009882.1_:c846798-845314	Proteína Hipotética A1G_05015	-2,05	-1,98
ref NC_009882.1_:c868072-867395	Proteína Hipotética A1G_05140	-2,16	-2,39
ref NC_009882.1_:875046-875333	Proteína Hipotética A1G_05190	-6,27	-4,46
ref NC_009882.1_:c875454-875305	Proteína Hipotética A1G_05195	-7,99	-4,45
ref NC_009882.1_:c947519-946632	Proteína Hipotética A1G_05640	-2,38	-1,81
ref NC_009882.1_:983971-984123	Proteína Hipotética A1G_05920	-2,36	-2,02
ref NC_009882.1_:c987677-987333	Proteína Hipotética A1G_05940	-2,81	-2,59
ref NC_009882.1_:992452-993807	Proteína Hipotética A1G_05965	-2,76	-2,23
ref NC_009882.1_:c1015646-1014858	Proteína Hipotética A1G_06080	-4,90	-4,13
ref NC_009882.1_:c1026073-1025600	Proteína Hipotética A1G_06150	-1,98	-1,79
ref NC_009882.1_:1043231-1043452	Proteína Hipotética A1G_06275	-1,66	-1,67
ref NC_009882.1_:c1050287-1049916	Proteína Hipotética A1G_06330	-2,86	-2,52
ref NC_009882.1_:c1050466-1050275	Proteína Hipotética A1G_06335	-4,30	-3,32
ref NC_009882.1_:c1052108-1051542	Proteína Hipotética A1G_06355	-2,72	-2,05
ref NC_009882.1_:1117305-1117733	Proteína Hipotética A1G_06700	-2,95	-2,28
ref NC_009882.1_:c1164928-1163354	Proteína Hipotética A1G_06985	-2,01	-1,66
ref NC_009882.1_:c1175920-1175135	Proteína Hipotética A1G_07015	-1,71	-1,88
ref NC_009882.1_:c1193675-1193313	Proteína Hipotética A1G_07135	-4,88	-3,92
ref NC_009882.1_:1237534-1238550	Proteína Hipotética A1G_07385	-2,28	-1,94
ref NC_009882.1_:c1241293-1241123	Proteína Hipotética A1G_07410	-1,93	-2,03
ref NC_009882.1_:c1241821-1241363	Proteína Hipotética A1G_07415	-2,43	-2,29

APÊNDICE F – Artigo de Periódico

Galletti, MFBM; Fujita, A; Nishiyama-Jr, MY; Malossi, CD; Pinter, A; Soares, JF; Daffre, S; Labruna, MB; Fogaca, AC. (2013) Natural blood feeding and temperature shift modulate the global transcriptional profile of *Rickettsia rickettsii* infecting its tick vector. PlosOne (submetido).

PLOS ONE

Natural Blood Feeding and Temperature Shift Modulate the Global Transcriptional Profile of *Rickettsia rickettsii* Infecting Its Tick Vector --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-13-10640R2
Article Type:	Research Article
Full Title:	Natural Blood Feeding and Temperature Shift Modulate the Global Transcriptional Profile of <i>Rickettsia rickettsii</i> Infecting Its Tick Vector
Short Title:	In vivo transcriptional profile of <i>R. rickettsii</i>
Corresponding Author:	Andrea Cristina Fogaca, Ph.D. University of São Paulo São Paulo, São Paulo BRAZIL
Key words:	<i>Rickettsia</i> ; Tick; Rock Mountain Spotted Fever; Bacterium; arthropod; transcriptome; gene expression; microarray; microfluidic RT-qPCR; temperature shift; blood feeding; T4SS; antioxidant; vector-pathogen interaction; stress response
Abstract:	<i>Rickettsia rickettsii</i> is an obligate intracellular tick-borne bacterium that causes Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF), the most lethal spotted fever rickettsiosis. When an infected starving tick begins blood feeding from a vertebrate host, <i>R. rickettsii</i> is exposed to a temperature elevation and to components in the blood meal. These two environmental stimuli have been previously associated with the reactivation of rickettsial virulence in ticks, but the factors responsible for this phenotype conversion have not been completely elucidated. Using customized oligonucleotide microarrays and high-throughput microfluidic qRT-PCR, we analyzed the effects of a 10°C temperature elevation and of a blood meal on the transcriptional profile of <i>R. rickettsii</i> infecting the tick <i>Amblyomma aureolatum</i> . This is the first study of the transcriptome of a bacterium in the genus <i>Rickettsia</i> infecting a natural tick vector. Although both stimuli significantly increased bacterial load, blood feeding had a greater effect, modulating five-fold more genes than the temperature upshift. Certain components of the Type IV Secretion System (T4SS) were up-regulated by blood feeding. This suggests that this important bacterial transport system may be utilized to secrete effectors during the tick vector's blood meal. Blood feeding also up-regulated the expression of antioxidant enzymes, which might correspond to an attempt by <i>R. rickettsii</i> to protect itself against the deleterious effects of free radicals produced by fed ticks. The modulated genes identified in this study, including those encoding hypothetical proteins, require further functional analysis and may have potential as future targets for vaccine development.
Order of Authors:	Maria Fernanda B. M. Galletti André Fujita Milton Y. Nishiyama-Jr Camila D. Malossi Adriano Pinter João F. Soares Sirlei Daffre Marcelo B. Labruna Andrea Cristina Fogaca, Ph.D.

Natural Blood Feeding and Temperature Shift Modulate the Global Transcriptional Profile of *Rickettsia rickettsii* Infecting Its Tick Vector

Maria Fernanda B. M. Galletti¹, André Fujita², Milton Y. Nishiyama-Jr³, Camila D. Malossi¹, Adriano Pinter⁴, João F. Soares⁵, Sirlei Daffre¹, Marcelo B. Labruna⁵, Andréa C. Fogaça^{1*}

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Departamento de Ciências da Computação, Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁴Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), São Paulo, Brazil, ⁵Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Abstract

Rickettsia rickettsii is an obligate intracellular tick-borne bacterium that causes Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF), the most lethal spotted fever rickettsiosis. When an infected starving tick begins blood feeding from a vertebrate host, *R. rickettsii* is exposed to a temperature elevation and to components in the blood meal. These two environmental stimuli have been previously associated with the reactivation of rickettsial virulence in ticks, but the factors responsible for this phenotype conversion have not been completely elucidated. Using customized oligonucleotide microarrays and high-throughput microfluidic qRT-PCR, we analyzed the effects of a 10°C temperature elevation and of a blood meal on the transcriptional profile of *R. rickettsii* infecting the tick *Amblyomma aureolatum*. This is the first study of the transcriptome of a bacterium in the genus *Rickettsia* infecting a natural tick vector. Although both stimuli significantly increased bacterial load, blood feeding had a greater effect, modulating five-fold more genes than the temperature upshift. Certain components of the Type IV Secretion System (T4SS) were up-regulated by blood feeding. This suggests that this important bacterial transport system may be utilized to secrete effectors during the tick vector's blood meal. Blood feeding also up-regulated the expression of antioxidant enzymes, which might correspond to an attempt by *R. rickettsii* to protect itself against the deleterious effects of free radicals produced by fed ticks. The modulated genes identified in this study, including those encoding hypothetical proteins, require further functional analysis and may have potential as future targets for vaccine development.

Introduction

The obligate Gram-negative intracellular bacterium *Rickettsia rickettsii* (Order: Rickettsiales, Family: Rickettsiaceae) is the etiological agent of Rocky Mountain spotted fever (RMSF), the most lethal spotted fever rickettsiosis. RMSF has been reported in different countries on the American continent (for review, see [1,2]). In Brazil, where the disease is known as Brazilian spotted fever (BSF), a high fatality rate (around 40%) has been recorded [2]. The endemic areas of BSF coincide with the presence of *Amblyomma cajennense* ticks, the major vector for *R. rickettsii*, and of *Amblyomma aureolatum* ticks, an important vector in the metropolitan area of the city of São Paulo [2]. Importantly, in this area, domestic dogs are the primary hosts that sustain natural populations of adult *A. aureolatum* ticks [2].

When an infected starving tick on the ground attaches to the warm skin of a vertebrate host and begins blood feeding, *R. rickettsii* is exposed to a temperature elevation as well as to the components of the blood meal, which is a rich source of nutrients. These factors have been previously associated with the reactivation of rickettsial virulence in ticks [3,4,5,6]. However, the mechanisms responsible for this phenotype conversion have not been completely elucidated. Bacteria significantly alter their transcriptome in response to environmental changes to adapt to different conditions. Therefore, studying the global transcriptional profile of pathogens under specific biological conditions can reveal the role of gene sets or pathways in adaptive processes (for review, see [7,8]).

The effects of temperature shifts and/or nutrient restriction on the gene expression profile of bacteria from the genus *Rickettsia* have been previously reported [9,10,11,12]. Nonetheless, all the previous studies were performed using bacteria infecting *in vitro* cultures of vertebrate and/or invertebrate cells. In the current study, we present the first transcriptional profile of *R. rickettsii* infecting a natural vector, the tick *Amblyomma aureolatum*. Using oligonucleotide microarrays and high-throughput microfluidic qPCR, the effects of two environmental stimuli were analyzed: a temperature shift and the acquisition of a blood meal by the tick. Although these two stimuli significantly promoted bacterial replication, blood feeding had a greater effect, also modulating five-fold more genes than the temperature shift. Blood feeding induced the expression of antioxidant enzymes, which might correspond to an attempt by *R. rickettsii* to protect itself against free radicals produced by fed ticks. Genes encoding Type IV Secretion System (T4SS) components were also up-regulated by blood feeding, suggesting that this system might play a role in secreting rickettsial effectors during the acquisition of a blood meal by a tick vector.

Interestingly, RT-qPCR data

showed that the effects of blood feeding combined to temperature upshift is similar to the effects of blood feeding alone, strengthening that the acquisition of the blood meal by the tick triggers major alterations on *R. rickettsii* gene expression. The products of the modulated genes identified in this work, including the hypothetical proteins, should be functionally characterized and may have potential as targets for vaccine development.

Methods

Ethics Statement

The protocol used in this work was approved by both Animal Experimentation Ethics Committees of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics (University of São Paulo, São Paulo, Brazil) and the Institute of Biomedical Sciences (University of São Paulo, São Paulo, Brazil). Guinea pigs and rabbits were purchased from commercial breeders that produce these animals for research use only. Guinea pigs were bought from Anilab (Paulínea, São Paulo, Brazil) and rabbits were bought from Criex (Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil). Domestic dogs were obtained from the Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health of the University of São Paulo under the coordination of one of the co-authors (MBL) of the present study. These dogs are bred for research use only. Animals are euthanized through the intraperitoneal injection of a combination of ketamine and xylazine.

Rickettsia rickettsii and *Amblyomma aureolatum*

In this study, we used the virulent Taiaçu strain of *R. rickettsii* that was originally isolated from a naturally infected *A. aureolatum* tick by inoculating guinea pigs with the tick homogenate [13]. Since its isolation, this strain has been maintained via cryopreservation of infected organs from the guinea pigs.

We also used adult females from the fifth generation of an *A. aureolatum* laboratory colony, which started with engorged females (F₀) collected from domestic dogs in Atibaia in the state of São Paulo. Ticks from this colony were first infected with the Taiaçu strain of *R. rickettsii* by feeding F₁ larvae on guinea pigs inoculated with the cryopreserved organs from the infected guinea pigs, as detailed in [14]. Therefore, ticks were exposed to a *R. rickettsii* strain that has never been cultured *in vitro*. During the previous four laboratory generations, *R. rickettsii* was maintained by transstadial perpetuation and transovarial transmission in 100% of the individuals in this colony [15]. In addition, *R. rickettsii* was shown to be highly virulent; all the guinea pigs and rabbits that served as hosts during the larval, nymph, or adult stages in the F₁ through F₄ generations developed severe clinical illness, with a 50% fatality rate among the guinea pigs [15]. Off-host developmental stages were held in an incubator at 25°C and 95% relative humidity (RH).

Exposure to environmental stimuli

R. rickettsii-infected unfed adult females (F₅) were incubated at either 25°C (Group 1, G1) or 35°C (Group 2, G2) for 3 days or fed on domestic dogs (*Canis familiaris*) for 3 days (Group 3, G3). Canine infestations were performed as previously described [15] except the ticks were manually detached from the dogs on the third feeding day. Immediately after incubation or feeding, the ticks were washed in 70% ethanol and sterile phosphate-buffered saline (PBS) (10 mM NaH₂PO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, and 2.7 mM KCl, pH 7.4) for 10 minutes each. To collect organs, the tick cuticle was carefully cut, and the integument was separated from the internal organs, which were transferred to 100 µL RNA*later*[®] Solution (Life Technologies, USA).

DNA and RNA extraction

Genomic DNA (gDNA) and total RNA from the organs of each individual tick were obtained simultaneously using the InviTrap[®] TwinSpin Cell Mini Kit (STRATEC, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Real-time quantitative PCR (qPCR) to quantify *R. rickettsii*

The total number of rickettsiae per adult female tick was quantified by real-time qPCR using specific primers and a TaqMan[®] probe for the citrate synthase gene (*gltA*) as previously described [16] except for a few modifications, including deleting two bases in the sense primer [17]. Briefly, 8 pmol of each *gltA*-specific primer (sense and antisense), 0.2 pmol of probe and 100 ng of gDNA were added to 10 µL of Quantimix Easy Probes Kit (Biotools, Spain), and the reaction volume was brought to 20 µL with ultrapure water. The reactions were performed on a Mastercycler[®] ep Realplex² detection system (Eppendorf, Germany) using the following thermocycler program: 2 minutes at 95°C followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C, 15 seconds at 55°C, and 20 seconds at 68°C. Three technical replicates were analyzed for each sample.

Microarray design

The complete genome sequence of the Sheila Smith strain of *R. rickettsii* (GenBank CP000848.1) [18] was submitted to the Agilent eArray web tool for gene expression probe design (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>). Subsequently, a total of 13,049 60-mer probes representing 99.5% of the bacterial genome (at least six probes per coding sequence) were spotted on an 8 x 15k chip.

RNA amplification and labeling

Each of the two biological replicates used in the microarray experiments contained total RNA from seven adult females harboring between 1.6 x 10⁸ and 2.2 x 10⁸ bacteria. After DNaseI (Promega, USA) treatment, RNA was reverse transcribed and amplified using the MessageAmp[™] II – Bacteria RNA

Amplification Kit (Life Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions. To obtain technical replicates (dye swap), the resulting amplified RNA (aRNA) was divided into two samples that were independently labeled with Cy3 or Cy5 using the Genomic DNA ULSTM Labeling Kit (Agilent Technologies, USA). After labeling, G2 samples were mixed with either G1 (to evaluate the effects of a temperature shift) or G3 (to evaluate the effects of blood feeding) samples and hybridized to the microarrays according to the Gene Expression FFPE protocol (Agilent Technologies, USA). Total RNA obtained from non-infected ticks was also similarly processed and hybridized to the *R. rickettsii* microarray to check probe specificity. The coding sequences (CDS) represented by microarray oligonucleotides that cross-hybridized with non-infected *A. aureolatum* transcripts were removed from the data analysis.

Microarray scanning and data analyses

The chips were scanned on a High-Resolution C Scanner (Agilent Technologies, USA). Images were visually inspected in order to detect eventual air bubbles and dust. Both signal data extraction and spot quality control were carried out using Feature Extraction 10.5 (Agilent Technologies) with default parameters. Spots with low quality, identified by Feature Extraction 10.5, were set to "not available" (NA) and were removed from the dataset. Data were normalized using the loess algorithm as implemented previously [19]. Fold-changes were obtained by calculating the mean value of a gene (summation of normalized probe intensity divided by the number of probes for each gene) and subsequently by calculating the ratios of the normalized intensities of the G2/G1 and G3/G2 samples. Only genes where 65% of the probes exhibited the same transcriptional pattern and a fold-change ≥ 1.5 in both biological replicates were considered to be modulated.

A detailed microarray description can be found in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database under Accession Number GPL16681. The complete dataset (Accession Number GSE44349) is publicly available according to MIAME guidelines [19].

Conserved domain analysis

The complete list of the modulated hypothetical proteins was screened for the presence of conserved domains using the NCBI Conserved Domain Database (CDD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>).

Microfluidic high-throughput RT-qPCR

To validate the microarray data, specific primers for 85 selected genes (Table S1) were designed using Primer3 [20] and synthesized by Life Technologies (USA). Two hundred ng of the RNA extracted from total organs of one *A. aureolatum* were used as template for reverse transcription (RT) in complementary DNA (cDNA) using M-MLV Reverse Transcriptase (Life Technologies, USA) according to manufacturer's protocol. Twenty biological

replicates (adult females harboring between 2.0×10^8 and 5.7×10^8 rickettsiae) from each biological group (G1, G2 and G3) were analyzed. cDNA was pre-amplified using a mixture containing the 85 primer pairs (200nM each) and the TaqMan® PreAmp Master Mix 2x (Life Technologies, USA). Amplification reactions were carried out on a Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Germany) with a thermocycler program of 95°C for 10 minutes and 14 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 4 minutes each. Pre-amplified cDNA samples and primers were combined in wells of a 96x96 chip (Fluidigm, USA) using the integrated fluidic circuit (IFC) controller (Fluidigm, USA) following manufacturer's instructions. Reactions were performed on a BioMark™ reader (Fluidigm, USA) using a thermocycler program of 50°C for 2 minutes, 70°C for 30 minutes, 25°C for 10 minutes, 50°C for 120 minutes and 95°C for 10 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 60 seconds. In order to exclude non-specific primers, the same procedure was performed using pre-amplified cDNA samples of non-infected females. To determine the efficiency of each primer pair, standard curves were generated using five serial dilutions (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) of a unique cDNA sample composed by a pool of pre-amplified cDNAs from all biological samples. Only primers presenting efficiencies between 90-100% were considered.

The threshold cycle (Ct) was determined using the BioMark™ qPCR analysis software (Fluidigm, USA). Threshold values were normalized according to the Ct of the reference gene (methionyl-tRNA synthetase), which is expressed at similar levels under all conditions tested, according to our microarray and RT-qPCR data. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ equation [20] was used to calculate the relative expression of select genes in G2 versus G1 (to evaluate the effects of a temperature shift), G3 versus G2 (to evaluate the effects of exposure to blood feeding), and G3 versus G1 (to evaluate the combined effects of both stimuli). To identify the outliers, we considered the Tukey criterion [22]. The medians of fold-changes of samples from the same biological group were analyzed using the Wilcoxon test to statistically validate the differentially expressed genes. *P*-values were corrected for multiple comparisons by the False Discovery Rate (FDR) method [21]. Data was considered significantly different at $p < 0.05$.

Results

Global gene expression analysis

To obtain *Rickettsia rickettsii* samples for the transcriptional studies, we performed a laboratory-controlled blood feeding infection of ticks with the virulent Tiaçu strain. *Amblyomma aureolatum* F₁ larvae were fed on experimentally infected *Cavia porcellus* and reared through five consecutive generations in the laboratory. After the F₅ adults emerged, unfed females were

incubated at either 25°C (G1) or 35°C (G2) for 3 days or were fed on dogs (G3) for 3 days. Real-time quantitative PCR demonstrated that 100% of the ticks in the three biological groups were infected with *R. rickettsii*. Moreover, the bacterial load in G3 ($7.2 \pm 4.0 \times 10^8$) and in G2 ($3.4 \pm 2.2 \times 10^8$) is higher than in G1 ($2.2 \pm 2.0 \times 10^8$) ticks (Figure 1), suggesting that both temperature upshift and blood feeding stimulated rickettsial replication.

Total RNA from infected ticks was reverse transcribed, amplified, and labeled for hybridization to oligonucleotide microarrays representing 99.5% of the 1,345 CDS of the Sheila Smith strain of *R. rickettsii*. As a control, total RNA extracted from uninfected ticks was similarly processed and hybridized to *R. rickettsii* microarrays. CDS represented by probes that cross-hybridized with the control transcripts (5.7%) were removed from the data analysis (data not shown). A similar percentage of cross-hybridization with host-cell transcripts was observed by [12].

Microarray screening showed that a 10°C temperature increase modulated the expression of 44 rickettsial genes with a fold-change ≥ 1.5 , of which 14 encoded proteins with annotated function (Table S2) and 30 encoded hypothetical proteins (Table S3). On the other hand, the acquisition of a blood meal by the tick vector affected the expression of 221 genes, which comprised 118 proteins with annotated function (Table S4) and 103 hypothetical proteins (Table S5). These results indicated that blood feeding substantially affected the *R. rickettsii* gene expression profile, leading to the differential expression of five-fold more genes than the temperature shift.

Among the 44 genes modulated by the temperature increase, 25 were induced and 19 were repressed. The COG (Clusters of Orthologous Groups) functional categories that comprised the majority of the up-regulated genes with annotated function were (i) posttranslational modification and protein turnover and (ii) inorganic ion transport and metabolism (Figure 2A). The down-regulated genes were equally distributed in the following categories: (i) nucleotide, (ii) carbohydrate, and (iii) lipid transport and metabolism; (iv) energy production and conversion; and (ii) replication, recombination, and repair (Figure 2A).

Of the 221 genes differentially expressed in fed compared with unfed ticks in G2, 80 were up-regulated and 141 were down-regulated. Most of the annotated down-regulated genes were involved in translation, ribosomal structure, and biogenesis, whereas the majority of the up-regulated genes were associated with the following categories: (i) energy production and conversion; (ii) replication, recombination, and repair; and (iii) intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport (Figure 2B).

Certain up-regulated genes in the last category encode components of the Type IV Secretion System (T4SS; VirB8, VirB9, VirB10, VirB11, and VirD4) (Table S4). Differently, *virB3*, which encodes another T4SS component, was repressed. Remarkably, three genes encoding the cell surface antigen-like protein Sca8 and one encoding Sca10 were significantly down-regulated (fold-change ≥ 2.0) by blood feeding, and the gene expression of enzymes related to

protection against oxidative stress (ferredoxin, glutaredoxin 3, and thioredoxin peroxidase 1) was induced (Table S4).

In silico domain analysis of the hypothetical proteins

As expected, numerous genes encoding hypothetical proteins in *R. rickettsii* were modulated by both temperature change and blood feeding (Tables S3 and S5, respectively). The nucleotide sequences of all the genes encoding hypothetical proteins were submitted for a bioinformatics search against the NCBI Conserved Domain Database (CDD). Of the 133 analyzed sequences, 89 contained domains related to other proteins in the CDD (Tables S3 and S5). Analyzing the hypothetical proteins modulated by temperature change revealed that they contained domains similar to SpoT (A1G_06100) and iron permease (A1G_03065) (Table S3). Interestingly, two hypothetical proteins similar to VirB6 (A1G_00820 and A1G_00825), one to VirB2 (A1G_01380), two to ankyrin repeat proteins (A1G_02840 and A1G_04305), and one to thioredoxin (A1G_00185) were among the hypothetical proteins modulated by blood feeding (Table S5).

Microarray data validation

In order to validate the microarray data, 35 modulated genes were analyzed by high-throughput microfluidic RT-qPCR (Table 1). In addition, the gene expression of 26 genes that were previously reported to play an important role in bacterial physiology, stress response, and/or virulence [22,23,24,25,26,27,28,29,30, 31,32,33] was also analyzed (Table 2). All the 61 primer pairs presented efficiencies between 90% and 100% and were used to calculate the relative expression in G2 versus G1 (to evaluate the effects of temperature upshift), G3 versus G2 (to evaluate the effects of exposure to blood feeding) and G3 versus G1 (to evaluate the combined effects of both stimuli). No amplification was detected when cDNA from non-infected females was used as template in reactions, attesting primer specificity. There was an overall concordance of 100% between the microarray and the RT-qPCR analyses (Table 1). Interestingly, a similar modulation profile was observed upon blood feeding alone or combined to the temperature upshift for 48 from the 61 analyzed genes (Tables 1 and 2). The other 13 genes presented different patterns or transcription levels were not statistically significant.

Discussion

Global transcriptional studies are a useful tool to investigate the response of *rickettsiae* to environmental stimuli using *in vitro* vertebrate and invertebrate host cell cultures [9,10,11,12,34]. In this study, we used customized oligonucleotide microarrays to evaluate the global transcriptional profile of the obligate intracellular bacterium *Rickettsia rickettsii* infecting its vector, the

Amblyomma aureolatum tick. To the best of our knowledge, this is the first report on the gene expression of a highly virulent bacterium in the genera *Rickettsia* infecting a natural tick vector. The genome of the Sheila Smith strain of *R. rickettsii* (GenBank CP000848.1) was used as reference to design the oligonucleotide microarrays. A genomic comparison of this virulent strain with the avirulent Iowa strain had shown 143 deletions and 492 single nucleotide polymorphisms (SNPs) between the two genomes [18]. Among the SNPs, 339 were found in predicted open reading frames (ORFs), but only 188 SNPs result in non-synonymous amino acid substitutions [18]. Moreover, only four genes were differentially expressed by hybridization of the RNA of the virulent strains Sheila Smith or R with microarrays containing both the Sheila Smith and Iowa genomes, indicating that the genetic differences between the two strains do not alter gene expression [18].

Because of limited rickettsial RNA in infected ticks, we performed whole transcriptome linear amplification prior to RNA labeling and microarray hybridization. As demonstrated previously [34,35,36], this procedure is critical for obtaining good transcriptional data. Using this methodology, we investigated the influence of two environmental stimuli, a 10°C temperature elevation and the acquisition of a blood-meal by the tick vector, on *R. rickettsii* global gene expression. In total, 265 genes were detected to be modulated by either the temperature upshift or blood feeding. Thirty five of the 265 modulated genes (>13%) were selected for further high-throughput RT-qPCR analysis. A correlation of 100% between RT-qPCR and microarray data was obtained, which increased our confidence in the microarray data.

The temperature upshift and blood feeding, which have been previously associated with the reactivation of rickettsial virulence in ticks [3,4,5,6], specifically altered the expression of distinct gene sets. Remarkably, blood feeding modulated five-fold more genes than the temperature shift. The substantial change in the *R. rickettsii* transcriptional profile elicited by the blood meal coincided with increased bacterial load in fed compared with starving ticks. Therefore, it is plausible to suppose that nutrients in the blood meal may stimulate bacterial proliferation in fed ticks. In fact, 16 of the 80 genes up-regulated by the blood meal were related to (i) energy production and conversion or (ii) replication, recombination, and repair. Nonetheless, genes involved in translation, ribosomal structure, and biogenesis are mostly down-regulated. Therefore, we can hypothesize that *R. rickettsii* may repress translation and ribosome structure/biogenesis genes when nutrients are abundant to avoid a disordered proliferation, what could lead to vector's death. The repression of the 30S ribosomal protein S2 (A1G_00680) was validated by RT-qPCR. We also observed that the encoding genes for two ATP/ADP carrier proteins (A1G_00515 and A1G_06265) and one glycerol-3-phosphate transporter (A1G_00520) are repressed in fed ticks, suggesting that a fewer number of membrane transporter molecules are necessary in a nutrient-rich environment.

Blood acquisition also up-regulated genes associated with trafficking and secretion, including components of the Type IV Secretion System (T4SS). The T4SS is a protein complex that delivers macromolecules (effectors) from the bacterium to the host cell where they interact with host proteins, enabling bacterial replication and survival [37]. Its importance has been studied in members of the Order Rickettsiales, such as *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* (for review, see [23]), and in *Coxiella burnetii* [38]. Here, we demonstrated that blood feeding modulated the expression of *R. rickettsii* genes that encode T4SS components. The expression of *virB3*, *virB9*, *virB10*, *virB11*, and *virD4* was statistically validated by microfluidic RT-qPCR. These data indicated that this bacterial transport system might play an important role in secreting rickettsial effectors during blood meal acquisition by the tick vector. However, whereas *virB9*, *virB10*, *virB11*, and *virD4* were induced by this stimulus, *virB3* was repressed. Because *virB3* is located on a different region of the *R. rickettsii* chromosome (Figure 3), it is possible that this gene is controlled by a different regulatory mechanism. Interestingly, two hypothetical protein-encoding genes, A1G_00820 and A1G_00825, that are located downstream of *virB3* (Figure 3) were also repressed by tick blood feeding, while the modulation of the ATPase VirB4 (A1G_00815) was not detected. These two hypothetical proteins contain VirB6 domains (Tables 2 and S5) and were also statistically validated by RT-qPCR. The presence of two copies of VirB6 in *R. rickettsii* agrees with a previous analysis of T4SS components in the genomes of several species of the genera *Rickettsia* [39]. Additionally, the hypothetical protein A1G_01380 was up-regulated by blood feeding and contains a VirB2 domain. This T4SS component has been previously described to be absent in *Rickettsia* spp. [39].

In contrast to what we observed, the gene expression of T4SS components was reported to be up-regulated during nutrient depletion in *R. conorii*, the causative agent of Mediterranean spotted fever [34]. Nevertheless, in addition to being a different species, the previously published study was performed *in vitro* using a culture of Vero cells as the host. The effects of nutrient deprivation were also investigated in *R. rickettsii* infecting Vero cells [12]. Under limiting iron conditions, five hypothetical protein-encoding genes were modulated with a fold-change ≥ 3.0 . One of the genes up-regulated by *in vitro* iron limitation encodes the hypothetical protein A1G_04305 [12]. We demonstrated that this protein encoding gene was repressed when *A. aureolatum* acquired a blood meal, which is a rich iron source. The domain analysis indicated that the hypothetical protein A1G_04305 contains ankyrin repeat domains (Table S5). Ankyrin repeat domains are protein motifs involved in protein-protein interactions that mediate diverse cellular processes [40]. Despite typically being found in eukaryotes, proteins containing ankyrin repeat domains (referred to as Anks) have also been described in bacteria, especially intracellular ones, where they act as T4SS effectors (for review, see [41,42]). Blood feeding down-regulated another gene encoding a hypothetical protein (A1G_02840) with

ankyrin repeat domain. It is possible that these two proteins act as T4SS effectors in mammals but not in ticks. The encoding genes of two additional ankyrin-repeat containing proteins (A1G_02960 and A1G_01255) were analyzed by RT-qPCR. Data showed that both genes are repressed by the blood meal, while A1G_01255 is induced by temperature upshift. Therefore, their role as T4SS effectors in host cells should be investigated.

The global transcriptional profile of the etiological agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, has been reported to be modulated by the addition of blood to *in vitro* cultures [43]. The genes encoding the outer surface protein C (OspC) and a Lon protease, an enzyme possibly involved in remodeling the spirochete outer surface, were up-regulated. In *R. rickettsii*, the acquisition of a blood meal by the tick vector statistically repressed three genes encoding the cell surface protein Sca8, one encoding Sca10, and one encoding Sca13. The Sca (surface cell antigen) group includes the two major *Rickettsia* surface proteins rOmpA (Sca0) and rOmpB (Sca5) (for review, see [44]). rOmpA and rOmpB were previously reported to be involved in the attachment and/or invasion of mammalian cells by rickettsiae [26,29]. In addition, it was demonstrated that the invasion of Vero cells by *R. conorii* involved the interaction of rOmpB with Ku-70, a 70 kDa host protein [30,45]. Although the modulation of rOmpA and rOmpB was not detected by microarray experiments, RT-qPCR analysis showed that rOmpB is up-regulated upon blood feeding alone or combined to temperature upshift. Therefore, studies on the role of rOmpB in invasion of vector and host cells are warranted.

The heme component of the blood meal contributes to the formation of free radicals in blood feeding arthropods (for review, see [46]). Therefore, it is plausible to suppose that *R. rickettsii* may be under oxidative stress in fed ticks. The production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) is an ancient immune response to infection and therefore is widespread in the animal kingdom (for review, see [47]). Indeed, the hemocytes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* have been reported to produce ROS when stimulated by bacteria [48]. ROS can oxidize DNA, lipids, and proteins, interfering with their function [49]. Importantly, it has been suggested that bacterial DNA may be the primary target of ROS when free iron concentrations are high [50]. In the current study, we demonstrated that blood feeding statistically induced the expression of three antioxidant enzymes (thioredoxin peroxidase 1, glutaredoxin 3, and ferredoxin) and one hypothetical protein with thioredoxin domain (A1G_00185). It is possible that the induction of these enzymes reflects an attempt by *R. rickettsii* to protect itself against the deleterious effects of free radicals in fed ticks. Interestingly, the glutaredoxin (Grx) and thioredoxin (Trx) systems are involved in returning the cellular proteome to normal after or during unfavorable conditions (for review, see [49]).

The exposure of *R. rickettsii* to a 10°C temperature increase also altered the global transcriptional profile of unfed ticks. This temperature upshift naturally occurs when a starving tick on the ground climbs onto a vertebrate host and contacts its warm skin. This stimulus, compared with blood feeding, did not extensively alter gene transcription. This limited response may partly be explained by the absence of an ideal microenvironment for the bacteria within the starving tick, where energy and nutrients are scarce. A limited gene expression response to temperature shift in *R. rickettsii* infecting a tick cell line (22°C to 37°C) or Vero cells (25°C to 34°C) *in vitro* has been reported [12]. Major gene expression alterations were only detected with larger temperature shifts [12]. In contrast, a temperature downshift (37°C to 25°C) was previously reported to modulate the expression of several genes in *R. typhi* in an *in vitro* cell culture model, down-regulating several chaperonins and heat shock proteins [11]. Under a similar temperature shift (25°C to 35°C), we observed the induction of only one heat shock protein (GrpE) by microarray experiments. The analysis of additional chaperones and heat shock proteins by microfluidic RT-qPCR showed that the encoding genes of the co-chaperone HscB and the chaperonin GroEL are also up-regulated by the temperature elevation, while the molecular chaperone DnaK and chaperone protein HscA are repressed. This indicates that a 10°C temperature elevation does not trigger a heat-shock response in *R. rickettsii* as observed in *R. typhi*. Interestingly, the cold shock-like protein A1G_05630 was up-regulated by a temperature upshift. Because A1G_05630 is the unique cold-shock protein in *R. rickettsii* genome, this role should be addressed.

In summary, we identified distinct effects of blood feeding and a temperature shift on the transcriptional profile of the obligate intracellular virulent pathogen *R. rickettsii* infecting its natural tick vector *A. aureolatum*. Both conditions modulated bacterial gene expression, although the analyses revealed that blood feeding caused more significant effects, for instance, increasing bacterial load. Interestingly, a similar transcriptional profile was observed upon blood feeding alone or combined to the temperature upshift. This result strengthens that the components of blood meal triggers major alterations in rickettsial gene expression modulation than the temperature upshift. These two environmental stimuli simulate the challenges that the bacterium is actually exposed to when infecting its natural tick vectors and have been previously associated with the reactivation of bacterial virulence. Therefore, this is an important approach for identifying key molecules involved in bacterial biological processes and vector interactions that may have potential as targets for vaccine development. The modulated genes identified in this study, including those encoding hypothetical proteins, should be functionally characterized.

Acknowledgements: We would like to thank Dr. Regina Maki Sasahara, Dr. Gerhard Wunderlich, and Dr. Roberto Marcondes Cesar Jr. for suggestions. We also thank Dr. Milton Moraes and Tiana Rosa de Brito for microfluidic RT-qPCR technical assistance. In addition, we would like to thank Dr. Rafael D. Rosa for assisting on figures editing, and Larissa Almeida Martins, Hebert Sousa Soares, and Francisco Borges Costa for technical assistance in tick colony maintenance.

References

1. Dantas-Torres F (2007) Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infect Dis* 7: 724-732.
2. Labruna MB (2009) Ecology of rickettsia in South America. *Ann N Y Acad Sci* 1166: 156-166.
3. Spencer RR, Parker RR (1923) Rocky Mountain spotted fever: infectivity of fasting and recently fed ticks. *Public Health Reports* 38: 333-339.
4. Policastro PF, Munderloh UG, Fischer ER, Hackstadt T (1997) *Rickettsia rickettsii* growth and temperature-inducible protein expression in embryonic tick cell lines. *J Med Microbiol* 46: 839-845.
5. Gilford JH, Price WH (1955) VIRULENT-AVIRULENT CONVERSIONS OF *Rickettsia Rickettsii* IN VITRO. *Proc Natl Acad Sci U S A* 41: 870-873.
6. Hayes SF, Burgdorfer W (1982) Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* ticks: an ultrastructural analysis. *Infect Immun* 37: 779-785.
7. Konkel ME, Tilly K (2000) Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect* 2: 157-166.
8. Conway T, Schoolnik GK (2003) Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Mol Microbiol* 47: 879-889.
9. Rovey C, La MV, Robineau S, Matsumoto K, Renesto P, et al. (2005) Preliminary transcriptional analysis of *spoT* gene family and of membrane proteins in *Rickettsia conorii* and *Rickettsia felis*. *Ann N Y Acad Sci* 1063: 79-82.
10. Audia JP, Patton MC, Winkler HH (2008) DNA microarray analysis of the heat shock transcriptome of the obligate intracytoplasmic pathogen *Rickettsia prowazekii*. *Appl Environ Microbiol* 74: 7809-7812.
11. Dreher-Lesnicks SM, Ceraul SM, Rahman MS, Azad AF (2008) Genome-wide screen for temperature-regulated genes of the obligate intracellular bacterium, *Rickettsia typhi*. *BMC Microbiol* 8: 61.
12. Ellison DW, Clark TR, Sturdevant DE, Virtaneva K, Hackstadt T (2009) Limited transcriptional responses of *Rickettsia rickettsii* exposed to environmental stimuli. *PLoS One* 4: e5612.
13. Pinter A, Labruna MB (2006) Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann N Y Acad Sci* 1078: 523-529.
14. Labruna MB, Ogrzewalska M, Martins TF, Pinter A, Horta MC (2008) Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. *J Med Entomol* 45: 1156-1159.
15. Labruna MB, Ogrzewalska M, Soares JF, Martins TF, Soares HS, et al. (2011) Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. *Emerg Infect Dis* 17: 829-834.
16. Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, et al. (2004) *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol* 42: 90-98.
17. Guedes E, Leite RC, Prata MC, Pacheco RC, Walker DH, et al. (2005) Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 841-845.

18. Ellison DW, Clark TR, Sturdevant DE, Virtaneva K, Porcella SF, et al. (2008) Genomic comparison of virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa. *Infect Immun* 76: 542-550.
19. Ballman KV, Grill DE, Oberg AL, Therneau TM (2004) Faster cyclic loess: normalizing RNA arrays via linear models. *Bioinformatics* 20: 2778-2786.
20. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25: 402-408.
21. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 57: 289-300.
22. Walker DH, Feng HM, Popov VL (2001) Rickettsial phospholipase A2 as a pathogenic mechanism in a model of cell injury by typhus and spotted fever group rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg* 65: 936-942.
23. Rikihisa Y, Lin M (2010) Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia chaffeensis type IV secretion and Ank proteins. *Curr Opin Microbiol* 13: 59-66.
24. Winkler HH (1976) Rickettsial permeability. An ADP-ATP transport system. *J Biol Chem* 251: 389-396.
25. Heinzen RA, Hayes SF, Peacock MG, Hackstadt T (1993) Directional actin polymerization associated with spotted fever group *Rickettsia* infection of Vero cells. *Infect Immun* 61: 1926-1935.
26. Li H, Walker DH (1998) rOmpA is a critical protein for the adhesion of *Rickettsia rickettsii* to host cells. *Microb Pathog* 24: 289-298.
27. Beckwith J (2013) The Sec-dependent pathway. *Res Microbiol* 164: 497-504.
28. Rahman MS, Simser JA, Macaluso KR, Azad AF (2005) Functional analysis of secA homologues from rickettsiae. *Microbiology* 151: 589-596.
29. Uchiyama T, Kawano H, Kusuhara Y (2006) The major outer membrane protein rOmpB of spotted fever group rickettsiae functions in the rickettsial adherence to and invasion of Vero cells. *Microbes Infect* 8: 801-809.
30. Chan YG, Cardwell MM, Hermanas TM, Uchiyama T, Martinez JJ (2009) Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiol* 11: 629-644.
31. Uchiyama T (2012) Tropism and pathogenicity of rickettsiae. *Front Microbiol* 3: 230.
32. Rahman MS, Gillespie JJ, Kaur SJ, Sears KT, Ceraul SM, et al. (2013) *Rickettsia typhi* Possesses Phospholipase A2 Enzymes that Are Involved in Infection of Host Cells. *PLoS Pathog* 9: e1003399.
33. Hendrick JP, Hartl FU (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 62: 349-384.
34. La MV, Francois P, Rovey C, Robineau S, Barbry P, et al. (2007) Development of a method for recovering rickettsial RNA from infected cells to analyze gene expression profiling of obligate intracellular bacteria. *J Microbiol Methods* 71: 292-297.
35. Lawson JN, Johnston SA (2006) Amplification of sense-stranded prokaryotic RNA. *DNA Cell Biol* 25: 627-634.
36. Kang Y, Norris MH, Zarzycki-Siek J, Niernan WC, Donachie SP, et al. (2011) Transcript amplification from single bacterium for transcriptome analysis. *Genome Res* 21: 925-935.
37. Voth DE, Broederdorf LJ, Graham JG (2012) Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future Microbiol* 7: 241-257.
38. Chen C, Banga S, Mertens K, Weber MM, Gorbashieva I, et al. (2010) Large-scale identification and translocation of type IV secretion substrates by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 21755-21760.
39. Gillespie JJ, Ammerman NC, Dreher-Lesnick SM, Rahman MS, Worley MJ, et al. (2009) An anomalous type IV secretion system in *Rickettsia* is evolutionarily conserved. *PLoS One* 4: e4833.
40. Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 13: 1435-1448.
41. Voth DE (2011) ThANKs for the repeat: Intracellular pathogens exploit a common eukaryotic domain. *Cell Logist* 1: 128-132.
42. Pan X, Luhrmann A, Satoh A, Laskowski-Arce MA, Roy CR (2008) Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science* 320: 1651-1654.

43. Tokarz R, Anderton JM, Katona LI, Benach JL (2004) Combined effects of blood and temperature shift on *Borrelia burgdorferi* gene expression as determined by whole genome DNA array. *Infect Immun* 72: 5419-5432.
44. Blanc G, Ngwamidiba M, Ogata H, Fournier PE, Claverie JM, et al. (2005) Molecular evolution of rickettsia surface antigens: evidence of positive selection. *Mol Biol Evol* 22: 2073-2083.
45. Martinez JJ, Seveau S, Veiga E, Matsuyama S, Cossart P (2005) Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. *Cell* 123: 1013-1023.
46. Graca-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GR, Paes MC, et al. (2006) Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 322-335.
47. Dzik JM (2010) The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim Pol* 57: 443-466.
48. Pereira LS, Oliveira PL, Barja-Fidalgo C, Daffre S (2001) Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Parasitol* 99: 66-72.
49. Stroher E, Millar AH (2012) The biological roles of glutaredoxins. *Biochem J* 446: 333-348.
50. Park S, You X, Imlay JA (2005) Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9317-9322.

Figures

Figure 1. Boxplot representation of *R. rickettsii* load in *A. aureolatum* adult females. The bacterial load in unfed ticks incubated at either 25°C (G1) or 35°C (G2) or fed on dogs (G3) was determined by qPCR using specific primers and a TaqMan probe for *gltA*. The medians are represented by thicker black lines. Outliers are represented by empty circles. * $p < 0.001$, Wilcoxon test.

Figure 2. Functional classification of *R. rickettsii* genes modulated by exposure to a 10°C increase in incubation temperature (A) or to blood feeding (B).

Figure 3. Location and orientation of genes encoding T4SS components repressed (A) or induced (B) by blood feeding in the *R. rickettsii* genome. Black arrows represent genes modulated in two biological replicates and grey arrows genes modulated in only one biological replicate in microarray experiments. The modulation of the ATPase VirB4 (A1G_00815; white arrow) was not observed.

Table 1. Transcript levels of selected genes of *R. rickettsii* analyzed by microarrays and high-throughput microfluidic RT-qPCR.

Gene ID	Annotation	Temperature shift			Blood feeding			Temperature shift + Blood feeding	
		Microarray	RT-qPCR	p-value	Microarray	RT-qPCR	p-value	RT-qPCR	
		Fold change (replicate 1; replicate 2)	Fold change		Fold change (replicate 1; replicate 2)	Fold change		Fold change	p-value
A1G_00295	cell surface antigen-like protein Sca10	ND	-1.67	0.0000	-2.33 (-2.39; -2.27)	-4.76	0.0000	-8.33	0.0000
A1G_00515	ADP,ATP carrier protein	ND	NS		-1.96 (-1.91; -2.02)	-2.17	0.0000	-2.13	0.0000
A1G_00520	glycerol-3-phosphate transporter	ND	NS		-1.73 (-1.62; -1.83)	-2.70	0.0000	-2.22	0.0000
A1G_00680	30S ribosomal protein S2	ND	1.41	0.0018	-2.46 (-2.62; -2.29)	-4.00	0.0000	-2.86	0.0000
A1G_00685	elongation factor Ts	ND	NS		-1.79 (-1.79; -1.78)	-2.94	0.0000	-2.70	0.0000
A1G_00810	type IV secretion system protein VirB3	ND	1.45	0.0016	-1.98 (-2.07; -1.89)	-2.78	0.0000	-1.92	0.0000
A1G_01445	cell surface antigen-like protein Sca8	ND	1.43	0.0080	-5.41 (-5.66; -5.15)	-12.5	0.0000	-8.33	0.0000
A1G_01495	ferredoxin	ND	NS		2.19 (2.30; 2.09)	1.36	0.0000	1.29	0.0012
A1G_01525	glutaredoxin 3	ND	-1.25	0.0019	2.68 (3.12; 2.23)	1.93	0.0000	1.54	0.0000
A1G_02205	virB9 protein	ND	-1.27	0.0045	2.38 (2.42; 2.35)	1.56	0.0000	NS	
A1G_02230	virB10 protein	ND	NS		1.72 (1.69; 1.76)	1.55	0.0000	1.81	0.0000
A1G_02235	type IV secretion system ATPase VirB11	ND	-1.35	0.0002	1.68 (1.70; 1.66)	2.00	0.0000	1.49	0.0000
A1G_02240	type IV secretion system component VirD4	ND	-1.19	0.0196	1.83 (1.72; 1.94)	1.64	0.0000	1.38	0.0000
A1G_02555	thioredoxin peroxidase 1	ND	NS		1.67 (1.59; 1.75)	1.84	0.0000	2.06	0.0000
A1G_02680	16S rRNA-processing protein RimM	ND	NS		-2.06 (-2.18; -1.93)	-2.78	0.0000	-2.33	0.0000
A1G_02785	site-specific tyrosine recombinase XerD	1.53 (1.53; 1.53)	1.86	0.0000	-2.69 (-2.52; -2.87)	-4.35	0.0000	-2.27	0.0000
A1G_03790	cell surface antigen	-1.79 (-1.99; -1.60)	-1.96	0.0000	ND	1.40	0.0002	0.72	0.0000

Microarray fold-changes represent the mean of the fold-changes of two biological replicates (1 and 2). ND: differential expression not detected by microarrays. RT-qPCR fold changes (mean of 20 biological replicates) with statistically significant differences with respect to are presented. NS: not significant differences in relation to control. [p<0.05; multiple comparisons by the False Discovery Rate (FDR) method]. Control: unfed ticks at 25°C (G1) for temperature upshift and combined effects of temperature upshift and blood feeding; unfed ticks at 35°C (G2) for blood feeding. Bold values represent genes with the same transcriptional pattern in both microarray and RT-qPCR experiments.

Table 1 (continued).

Gene ID	Annotation	Temperature shift			Blood feeding			Temperature shift + Blood feeding	
		Microarray	RT-qPCR	<i>p</i> -value	Microarray	RT-qPCR	<i>p</i> -value	RT-qPCR	<i>p</i> -value
		Fold change (replicate 1; replicate 2)	Fold change		Fold change (replicate 1; replicate 2)	Fold change		Fold change	
A1G_05315	chaperonin GroEL	ND	1.46	0.0006	-1.71 (-1.53; -1.88)	-2.27	0.0000	-1.54	0.0000
A1G_05630	cold shock-like protein	1.92 (1.98; 1.87)	1.36	0.0063	ND	-1.96	0.0000	-1.43	0.0002
A1G_05960	bicyclomycin resistance protein	1.57 (1.60; 1.53)	1.82	0.0000	ND	-5.88	0.0000	-3.33	0.0000
A1G_05625	ATP-dependent RNA helicase RhlE	ND	NS		-2.87 (-3.13; -2.62)	-4.76	0.0000	-3.85	0.0000
A1G_06265	ADP,ATP carrier protein	ND	1.47	0.0005	-2.30 (-2.20; -2.41)	-4.17	0.0000	-2.78	0.0000
A1G_06705	NADH dehydrogenase subunit J	ND	1.46	0.0018	-2.02 (-2.11; -1.93)	-4.17	0.0000	-2.86	0.0000
A1G_06710	NADH dehydrogenase subunit K	ND	NS		-4.08 (-4.59; -3.56)	-12.5	0.0000	-10.00	0.0000
A1G_06715	NADH dehydrogenase subunit L	ND	1.46	0.0124	-1.75 (-1.97; -1.54)	-7.14	0.0000	-5.00	0.0000
A1G_07470	DNA mismatch repair protein	-1.62 (-1.69; -1.54)	-1.22	0.0481	ND	1.32	0.0001	NS	
A1G_00825	hypothetical protein A1G_00825	ND	1.62	0.0012	-1.68 (-1.77; -1.59)	-3.03	0.0000	-1.85	0.0000
A1G_02840	hypothetical protein A1G_02840	ND	NS		-3.03 (-3.30; -2.77)	-6.67	0.0000	-7.14	0.0000
A1G_06350	hypothetical protein A1G_06350	ND	NS		3.57 (4.12; 3.01)	1.76	0.0000	1.86	0.0000
A1G_07480	hypothetical protein A1G_07480	-2.62 (-3.02; -2.21)	-1.49	0.0001	2.51 (2.41; 2.62)	2.39	0.0000	1.59	0.0000
A1G_00185	hypothetical protein A1G_00185	ND	NS		2.02 (2.13; 1.92)	2.00	0.0000	1.74	0.0000
A1G_00820	hypothetical protein A1G_00820	ND	1.77	0.0001	-1.83 (-1.88; -1.78)	-4.00	0.0000	-2.22	0.0000
A1G_01380	hypothetical protein A1G_01380	ND	NS		2.71 (2.69; 2.73)	2.35	0.0000	1.96	0.0000
A1G_03000	hypothetical protein A1G_03000	ND	2.53	0.0000	-7.2 (-8.32; -6.07)	-7.14	0.0000	-2.78	0.0000
A1G_06745	hypothetical protein A1G_06745	ND	NS		2.82 (2.94; 2.69)	1.69	0.0000	1.85	0.0000

Microarray fold-changes represent the mean of the fold-changes of two biological replicates (1 and 2). ND: differential expression not detected by microarrays. RT-qPCR fold changes (mean of 20 biological replicates) with statistically significant differences with respect to control are presented. NS: not significant differences in relation to control. Control: unfed ticks at 25°C (G1) for temperature upshift and combined effects of temperature upshift and blood feeding; unfed ticks at 35°C (G2) for blood feeding. [$p < 0.05$; multiple comparisons by the False Discovery Rate (FDR) method]. Bold values represent genes with the same transcriptional pattern in both microarray and RT-qPCR experiments.

Table 2. Transcript levels of selected genes of *R. rickettsii* analyzed by high-throughput microfluidic RT-qPCR.

Gene ID	Annotation	Temperature shift		Blood feeding		Temperature shift + Blood feeding	
		Fold change	p-value	Fold change	p-value	Fold change	p-value
A1G_00545	stage 0 sporulation protein J	-1.18	0.0058	-1.16	0.0047	-1.39	0.0000
A1G_00890	preprotein translocase subunit SecF	NS		-1.43	0.0000	-1.41	0.0000
A1G_01005	preprotein translocase subunit SecE	1.44	0.0000	-1.25	0.0003	1.15	0.0047
A1G_01150	outer membrane protein omp1	NS		-1.59	0.0000	-1.49	0.0000
A1G_01255	ankyrin repeat-containing protein	1.52	0.0017	-1.52	0.0013	NS	
A1G_01335	molecular chaperone DnaK	-1.41	0.0003	NS		-1.27	0.0094
A1G_01500	chaperone protein HscA	-1.16	0.0196	-1.37	0.0003	-1.61	0.0000
A1G_01505	co-chaperone HscB	1.70	0.0000	-1.37	0.0001	1.24	0.0088
A1G_02285	cysQ protein	1.34	0.0023	-1.27	0.0027	NS	
A1G_02675	outer membrane assembly protein	-1.12	0.0351	NS		-1.16	0.0179
A1G_02960	ankyrin repeat-containing protein	-1.67	0.0000	-1.33	0.0008	-2.22	0.0000
A1G_04625	hemolysin	1.21	0.0400	-1.52	0.0003	-1.25	0.0343
A1G_04750	cell division protein FtsL	NS		-1.43	0.0003	-1.41	0.0009
A1G_04855	preprotein translocase subunit SecA	-1.41	0.0000	NS		-1.25	0.0039
A1G_04935	preprotein translocase subunit YajC	1.17	0.0145	1.28	0.0001	1.50	0.0000
A1G_04940	preprotein translocase subunit SecD	-1.35	0.0001	NS		-1.27	0.0001
A1G_05085	patatin b1 precursor	NS		-1.59	0.0000	-1.85	0.0000
A1G_06030	outer membrane protein B (cell surface antigen sca5)	NS		1.49	0.0000	1.56	0.0000
A1G_06165	DNA polymerase III subunit epsilon	NS		-1.85	0.0000	-2.04	0.0000
A1G_06915	cell surface antigen-like protein Sca13	NS		-1.32	0.0000	-1.35	0.0000
A1G_07170	type II citrate synthase	-1.2	0.0038	NS		-1.28	0.0004
Rrlowa_1080	rickA Arp2/3 complex activation protein	-1.23	0.0227	-2.5	0.0000	-3.03	0.0000
A1G_00180	hypothetical protein A1G_00180	1.18	0.0241	1.61	0.0000	1.89	0.0000
A1G_00745	hypothetical protein A1G_00745	NS		-1.33	0.0449	NS	
A1G_03155	hypothetical protein A1G_03155	NS		-1.75	0.0000	-1.79	0.0000
A1G_04930	hypothetical protein A1G_04930	1.23	0.0068	1.24	0.0022	1.53	0.0000

RT-qPCR fold changes (mean of 20 biological replicates) with statistically significant differences with respect to control are presented. NS: not significant differences in relation to control. Control: unfed ticks at 25°C (G1) for temperature upshift and combined effects of temperature upshift and blood feeding; unfed ticks at 35°C (G2) for blood feeding. [p<0.05; multiple comparisons by the False Discovery Rate (FDR) method].

Table S1. Primers used in microfluidic RT-qPCR analysis.

CDS	Annotation	Sense (5' - 3')	Antisense (5' - 3')
ref NC_009882.1_c474839-474342	16S rRNA-processing protein RimM	TCITTTTCCGACCTGCTCA CA	CTCCTTTGGCA TTTTGGCTA
ref NC_009882.1_c114829-115716	30S ribosomal protein S2	CGCAATTAATGAAGCGGTAA A	ATCATCAATTCACGGGAATCG
ref NC_009882.1_c75811-77307	ADP/ATP carrier protein	GGCAAGCTGCTGTGAA GTT	TACAAAACCAACCGCAGGAA
ref NC_009882.1_c1040765-1042162	ADP/ATP carrier protein	TCTAGCTGACTGGATGGAA CG	CCAAAAGCTCGGCAAGACTA T
ref NC_009882.1_c815948-815700	ankyrin repeat-containing protein	ATACCTTTGCATGCGGTTG	TGCGTTGATATCAAGCA CCA T
ref NC_009882.1_c12474-12022	ankyrin repeat-containing protein	ATCAATCCGATGAGGATGGT	AGCCTCGTCAGACATCTTGG
ref NC_009882.1_c111968-11702	ankyrin repeat-containing protein	TATTAAGCTGCTGCCA CCGT	ATTCCCTTACCTCGGCA AAT
ref NC_009882.1_c514056-514307	ankyrin repeat-containing protein	GGCAGAGCGGTTAATAA AACA	TTTTAAGCGCTGTAATCTGTCAA
ref NC_009882.1_c513850-514026	ankyrin repeat-containing protein	CCCAAGAAAACAAAGTACCA TACA	CTCTAAAGCAGATACCACTTCTCA
ref NC_009882.1_c232567-232908	ankyrin repeat-containing protein	ATGA TGCTAGCGGCA GAAAG	AGGGAAAGTCAATTCGGTTTT
ref NC_009882.1_c720461-719856	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	CGA GAA GGGGATGCGTTA T	AGGGTTTCTTGAGCATGGATT
ref NC_009882.1_c616905-619217	ATP-dependent protease La	AAA GCTC AAA TTGCCA GA	ATCCAAAAGTGCCA TCTCG
ref NC_009882.1_c943449-942217	ATP-dependent RNA helicase RhlE	GTCA GCGTCAA CGTGAA AGA	GAGGAAATACAAAGCCCA CGA
ref NC_009882.1_c91314-992378	bicyclomycin resistance protein	GGGATATCATCGGTTGCA	AGGGCAAATAGTGCGCTTTA
ref NC_009882.1_c803667-803269	cell division protein FtsL	ACTTTTGCGGCTAGATTGG	TATATTTGGCCCTAACGGA TCTT
ref NC_009882.1_c652833-655895	cell surface antigen	TAACCAACCACTGCAACCTG	TTGCA TGCTCGCTGATAAAG
ref NC_009882.1_c262509-262940	cell surface antigen-like protein Sca8	GCTCTGTACTTAA CCGGTGCT	TGCTCGTTACGTCTGTTCT
ref NC_009882.1_c45976-46317	cell surface antigen-like protein Sca10	CCGGGACTACATGCTTCTGT	TGCTGCTAA TTGATGTTCTCAA
ref NC_009882.1_c1153524-1153240	cell surface antigen-like protein Sca13	GCA GTACTTCAAAAAGTGGGTGA T	TCCTTAAATTTTATGTGCGCAAC
ref NC_009882.1_c271743-269956	chaperone protein HscA	TCTCAATACTCGCGCACTTTTT	TGCAATTTCAGGCACTCTCA
ref NC_009882.1_c901984-901727	chaperonin GroEL	TTTTGGAGCCA TCCATTACC	GGTGGGCGACTATCCATATCT
ref NC_009882.1_c272234-271734	co-chaperone HscB	ATGCGCTAAAGCGTGCTGA	GCTTAAATTTATGCGCGGAAA
ref NC_009882.1_c944176-943964	cold shock-like protein	TTTGTACACAAATCA GCGGTAGA	CAGCATA GGGCTTTTCTGTC
ref NC_009882.1_c402739-403515	cysQ protein	TOGATCTTATGATGGGACA	ATATCAAGCGCATGGTTGG
ref NC_009882.1_c1249026-1247194	DNA mismatch repair protein	CCTTACTGCGTCAAAATGGAAA	CGTCCAAAATAAGCGTTGCGAT
ref NC_009882.1_c1028222-1028911	DNA polymerase III subunit epsilon	ACAAACAAAGTCAATCGAA TCGT	AGCCTCAACCGGCATATCTC
ref NC_009882.1_c1236834-1237097	DNA-damage-inducible protein J	AGCAGCTTATGCTCTTCTG	GTGGTTCAAACGCGCAATG
ref NC_009882.1_c115915-116844	elongation factor Ts	CGGTGACGAGTATGATGGAT	TGCA GCA GCA GCTAAACC
ref NC_009882.1_c1181808-1181458	ferredoxin	CACCGGGGTTAATAGAA TGG	ATTTATCGGCATCAGGCAAA
ref NC_009882.1_c275087-275395	glutaredoxin 3	AATA TGCA TGTTGGCGGTTG	CAGCAGGTGCACTGCTCTT
ref NC_009882.1_c77503-78798	glycerol-3-phosphate transporter	TGCAAA TGCA GCGCTTACAAA	CGCGACGACCTTGAATAAGT
ref NC_009882.1_c361975-362622	heme exporter protein B	TGGAAGA GCGGAAGCTTAGT	AACAAAACCGACCGCTA TOG
ref NC_009882.1_c783932-783177	hemolysin	GTAGTAGCA GCGCGGTTT	AGGATGAA GTCGCGCATAC
ref NC_009882.1_c1044404-1043505	hemolysin C	AATTGCA GCTCCTCTATGAAA	AAACCGTCAGTACCGCCATA
ref NC_009882.1_c577205-579712	leucyl-tRNA synthetase	TGGCAGTA CATTTGGCAAGA	CATGGATTTTACCGGAAGGGA
ref NC_009882.1_c500770-502338	lysyl-tRNA synthetase	CCTGAAATGTTGGGCACAGTA	GAGCGAA GCTTTGCATTCAT
ref NC_009882.1_c968241-966715	methionyl-tRNA synthetase	CGGTTTTCA TGCGGCTCTA TT	AAATTTCTGCCATCATTCG
ref NC_009882.1_c248307-246424	molecular chaperone DnaK	ATTGAAACCTCTGGCGGTTG	TTACGGCATGCTGGTTATCA
ref NC_009882.1_c1117766-1118383	NADH dehydrogenase subunit J	TCAGTAGCGGTA TGCGTTGTCTT	TTCTGCTCAACGAAATATCA
ref NC_009882.1_c1118376-1118690	NADH dehydrogenase subunit K	TGAGTTAATGCTGCTGCAGTT	GGCAGCTGCTACGCTTAAGA
ref NC_009882.1_c1118690-1120663	NADH dehydrogenase subunit L	ACCA TGGA TTGAGTTGGAA	TGACACCAATGTTACGCGCTA
ref NC_009882.1_c373645-373484	outer membrane protein OmpA	AGATTTCGCTACGTTGGGCTA	CCGACAGTACTGCTGGTTGA
ref NC_009882.1_c473994-471502	outer membrane assembly protein	TAGATGCTTCACTGCCACA	TAGCGGTAAATCGGCAATA
ref NC_009882.1_c1007464-1002500	outer membrane protein B (cell surface antigen sca5)	TGTTGCA GAGTTACAGGAA	AGTAGTACCGCGGCTTAAAA
ref NC_009882.1_c214853-212547	outer membrane protein omp1	TAGTCGGTACCGGGAAACCTG	CGCAAAGTGAATACCTCA CGA
ref NC_009882.1_c859725-861197	patatin b1 precursor	CGATTTTACTGGA GGGACCA	TTGCGCTGCACTGAATAAAG
ref NC_009882.1_c819688-816968	preprotein translocase subunit SecA	AAACGCGCAAA TTTCATGAGC	TACCGGCTGCTGCCATATTA
ref NC_009882.1_c97701-98159	preprotein translocase subunit SecB	CCGCAATATTCGCTTAATGC	ATCAATTGAGGGGCTGTGAT
ref NC_009882.1_c832661-834217	preprotein translocase subunit SecD	ATCTGGGTTTGCACCTATGC	CAACGCGCAAAACCTTTGATT
ref NC_009882.1_c177150-177350	preprotein translocase subunit SecE	TGTTGCTTCAACGTTAGTAGTGG	GCGGATATTAAGCAAAAGCTG
ref NC_009882.1_c156281-157207	preprotein translocase subunit SecF	GGCGGCTATGGCGATGTGTTAT	GTCA TGCACTAAGGGGATCA
ref NC_009882.1_c922200-920899	preprotein translocase subunit SecY	AATTTATGGA GCGCAAGCAA	ATTAGCAACGCTAGCAAGGAA
ref NC_009882.1_c832252-832677	preprotein translocase subunit YajC	GTGCTGCAGAAACAAA TTCT	TGTTGTTCTTGTGGAAGTAA
ref NC_009882.1_c1025600-1025133	ribonuclease H	GTGCGCGCTTTTACTACTT	CCCCGTTGATATTTTACGC
ref NC_009882.1_c125610-125777	ribose-phosphate pyrophosphokinase	TGTAGA GGGCAAAAATTTGAT	CCGATAAAGCGGCAATGCTCT
ref NC_009882.1_c125279-125629	ribose-phosphate pyrophosphokinase	TTTGGTTA TGCAAGGCAAGA	CATGGTTTACTCGAGCTTCTC
ref NC_0102632_c856717-858162	rickA Arp2/3 complex activation protein	GGAAATAACCAACGCTGCTTC	TGCAACCGGCTTTTCTGCTAT
ref NC_009882.1_c487702-488622	site-specific tyrosine recombinase XerD	CGCGTTTAA TCGGTTCTTCA	TTGAGAGCAATGTTCAAGTAAAG
ref NC_009882.1_c82427-83287	stage 0 sporulation protein J	AAATTTGCGCAGCTCTATTCAA	TGGGCTATTACTTCTGCTATGTC
ref NC_009882.1_c450224-449622	thioredoxin peroxidase 1	ATTTGTGCGGCAAACTGCTCT	TATCCGCTGCA GCA TAA GTT
ref NC_009882.1_c76576-677049	translation initiation factor F-3	ATGCA GCGGCGTGTGTAATC	TACAGACAGGGGATCACGCA
ref NC_009882.1_c1203242-1201938	type II citrate synthase	ATGGGTTTGGTCACTGCTGT	GTGCTGACTGCGCGAGTT
ref NC_009882.1_c393787-394791	type IV secretion system ATPase VirB11	AGAGCGCTGTTTGGCTTTAAG	TGAAACGCGGATGACCTGTAT
ref NC_009882.1_c394925-396700	type IV secretion system component VirD4	AGATGCAAGCTGGGCTAATC	GAAACCGCTTGCAACAAAAT
ref NC_009882.1_c134020-134307	type IV secretion system protein VirB3	GGTTAACTAGACCGGCGATG	TCATAATGCCGTTATTCGAAA
ref NC_009882.1_c392342-393790	virB10 protein	CGCGGCTCTTACCTCTACT	TGCA TGCTCTCAACTAAAG
ref NC_009882.1_c390274-389576	virB8 protein	ACTTTTGAA TCACTGGCAAAA	GGCATATCAAGTATGATTTGG
ref NC_009882.1_c391686-392159	virB9 protein precursor	TGCA TTTTGGCTTCAATCA	TGCCAAAGGATGTTATTTCCA
ref NC_009882.1_c31143-30847	hypothetical protein A1G_00180	TCAGGTACAA TGGTATGGTGC	GCGGCAATCATCTCTATTA
ref NC_009882.1_c32054-31221	hypothetical protein A1G_00185	AAACGAA TCAAGGAAGCGGTA	GAAACGCGGCTGTGATACTT
ref NC_009882.1_c125749-125973	hypothetical protein A1G_00745	AGACCTCTTGGAGAAAGAGC	CGTCAA TCAAGTATTCGATC
ref NC_009882.1_c137058-140018	hypothetical protein A1G_00820	CCGAGAGTCAA TGTACTGCT	CAACAGATTTTGGCGGAGAT
ref NC_009882.1_c140005-141990	hypothetical protein A1G_00825	TACACGCACTCCACTCCTCT	GAACTGCAAGAACGCGGAAAA
ref NC_009882.1_c255227-255586	hypothetical protein A1G_01380	GTGCGTGA TCGTGTAGGTGAG	TCGCAAGAACATTAATCCGACA
ref NC_009882.1_c418652-418861	hypothetical protein A1G_02360	CCGCTTCTGGGTTGTGCA	AGATGGTTTGTGCGTTGCTC
ref NC_009882.1_c499229-498807	hypothetical protein A1G_02840	TGCGTGTGTTGATGCAATTT	TCAA TAGAACGCGCTGTGCTC
ref NC_009882.1_c524900-524968	hypothetical protein A1G_03000	GCTTGGTGAATGCACTTATTT	GATAAAGGGGATTTGCGCTCA
ref NC_009882.1_c555321-555569	hypothetical protein A1G_03155	CAC TAGAAGTTCGCGCTCA TT	CCTTCA TTAATTCACCTTTGCC
ref NC_009882.1_c730245-729259	hypothetical protein A1G_04280	GGTACAA TAAACGGGGAAT	GCGGGAATGACATAAAGA
ref NC_009882.1_c832062-832241	hypothetical protein A1G_04930	GTTGGAAGCCAA GTAA GTGGT	CCTTTGATCTTCAAGCTTTGG
ref NC_009882.1_c871627-869777	hypothetical protein A1G_05165	TTCTGATGAAGGTACAACCTCGT	GGCTCTGAAATGACAGAAAA
ref NC_009882.1_c1020437-1020736	hypothetical protein A1G_06100	CACAAATGCGTCA GTCA GGT	GTA AAAAGCTTACGCGCTCG
ref NC_009882.1_c1051294-1051470	hypothetical protein A1G_06350	GCAAGGTGCAAGGTCAAGAT	AGTTAGCTGACGCTGTGAGACA
ref NC_009882.1_c1127890-1127534	hypothetical protein A1G_06745	GGGTCTTGGGTGGA TTGT	ACCGATGGCAACAGAAAG
ref NC_009882.1_c1250262-1250714	hypothetical protein A1G_07480	TTGGAGAA GTAGGTGATTTTGG	TGGTAACTCGCTACCTTTTT

Table S2. Genes of *R. rickettsii* encoding proteins with annotated function differentially expressed by the elevation of temperature.

Gene ID	CDS	Annotation	COG	Fold change	
				Biological replicate 1	Biological replicate 2
A1G_00390	ref NC_009882.1_:c57026-55992	putative DNA-binding/iron metalloprotein/AP endonuclease	COG0533O	1.98	1.72
A1G_00800	ref NC_009882.1_:132498-133136	ribosome biogenesis GTP-binding protein YsxC	COG0218R	1.87	1.61
A1G_02195	ref NC_009882.1_:c388225-387110	putative monovalent cation/H ⁺ antiporter, subunit D	COG0651CP	1.68	1.57
A1G_02785	ref NC_009882.1_:487702-488622	site-specific tyrosine recombinase XerD	COG4974L	1.53	1.53
A1G_05185	ref NC_009882.1_:c874676-873717	magnesium and cobalt transport protein CorA	COG0598P	1.66	1.52
A1G_05370	ref NC_009882.1_:909316-909915	grpE protein	COG0576O	1.62	1.80
A1G_05630	ref NC_009882.1_:c944176-943964	cold shock-like protein	COG1278K	1.98	1.87
A1G_05635	ref NC_009882.1_:c946479-945574	dimethyladenosine transferase	COG0030J	1.82	1.50
A1G_05960	ref NC_009882.1_:991314-992378	bicyclomycin resistance protein	COG2814G	1.60	1.53
A1G_03490	ref NC_009882.1_:608404-609831	succinate semialdehyde dehydrogenase	COG1012C	-1.79	-1.59
A1G_03670	ref NC_009882.1_:632043-633866	ribonucleotide-diphosphate reductase, subunit alpha	COG0209F	-1.78	-1.89
A1G_03790	ref NC_009882.1_:652833-655895	cell surface antigen	-	-1.99	-1.60
A1G_05000	ref NC_009882.1_:844068-844703	succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase, subunit B	COG2057I	-2.32	-1.95
A1G_07470	ref NC_009882.1_:c1249026-1247194	DNA mismatch repair protein	COG0323L	-1.69	-1.54

Table S3. Hypothetical protein encoding genes modulated by temperature shift.

CDS	Annotation	Domain identified by conserved domain analysis	E-Value	Fold change	
				Biological replicate 1	Biological replicate 2
ref NC_009882.1_:289631-290197	hypothetical protein A1G_01610	No conserved domains identified		2.06	2.10
ref NC_009882.1_:293809-293943	hypothetical protein A1G_01635	No conserved domains identified		1.75	1.54
ref NC_009882.1_:c346202-345054	hypothetical protein A1G_01945	AgrB super family[cl01873] - Accessory gene regulator B	8.85e-04	2.26	2.12
ref NC_009882.1_:c485893-485420	hypothetical protein A1G_02765	No conserved domains identified		2.29	1.69
ref NC_009882.1_:524000-524968	hypothetical protein A1G_03000	Fic/DOC family	2.07e-22	3.46	2.38
ref NC_009882.1_:525229-525366	hypothetical protein A1G_03005	No conserved domains identified		4.29	2.72
ref NC_009882.1_:526267-526467	hypothetical protein A1G_03015	No conserved domains identified		2.11	1.63
ref NC_009882.1_:c535744-534896	hypothetical protein A1G_03065	FTR1[pfam03239] - Iron permease FTR1 family	9.12e-60	1.99	1.61
ref NC_009882.1_:787589-787804	hypothetical protein A1G_04655	Transposase_20[pfam02371] - Transposase IS116/IS110/IS902 family	6.69e-08	1.84	1.94
ref NC_009882.1_:807614-807820	hypothetical protein A1G_04775	DNase_II[pfam03265] - Deoxyribonuclease II	2.99e-03	2.13	1.58
ref NC_009882.1_:875046-875333	hypothetical protein A1G_05190	No conserved domains identified		1.81	2.18
ref NC_009882.1_:c875454-875305	hypothetical protein A1G_05195	No conserved domains identified		2.99	2.57
ref NC_009882.1_:c947519-946632	hypothetical protein A1G_05640	SurA_N_3 super family[cl07813] - SurA N-terminal domain	2.06e-12	2.23	1.85
ref NC_009882.1_:c1026073-1025600	hypothetical protein A1G_06150	No conserved domains identified		1.76	1.85
ref NC_009882.1_:c1193675-1193313	hypothetical protein A1G_07135	No conserved domains identified		1.99	1.67
ref NC_009882.1_:c1226140-1225526	hypothetical protein A1G_07280	MFS[cd06174] - The Major Facilitator Superfamily (MFS)	8.65e-04	1.72	1.69
ref NC_009882.1_:283121-283303	hypothetical protein A1G_01585	HIG_1_N[pfam04588] - Hypoxia induced protein conserved region	2.52e-06	-2.24	-1.89
ref NC_009882.1_:c368094-367954	hypothetical protein A1G_02080	No conserved domains identified		-1.90	-1.52
ref NC_009882.1_:443651-444028	hypothetical protein A1G_02525	No conserved domains identified		-1.83	-1.63
ref NC_009882.1_:489832-490995	hypothetical protein A1G_02795	Lipoprotein_7[pfam01540] - Adhesin lipoprotein	2.65e-03	-2.07	-1.92
ref NC_009882.1_:520257-521780	hypothetical protein A1G_02985	Heme_Cu_Oxidase_I super family[cl00275] - Heme-copper oxidase subunit I	6.66e-18	-2.50	-1.99
ref NC_009882.1_:676096-676425	hypothetical protein A1G_03925	COG5346[COG5346] - Predicted membrane protein	2.16e-50	-1.70	-1.77
ref NC_009882.1_:691150-691590	hypothetical protein A1G_04030	COG5622[COG5622] - Protein required for attachment to host cells	4.84e-61	-2.31	-1.84
ref NC_009882.1_:c748277-748155	hypothetical protein A1G_04410	No conserved domains identified		-1.95	-1.85
ref NC_009882.1_:c759589-759365	hypothetical protein A1G_04500	No conserved domains identified		-2.22	-1.70
ref NC_009882.1_:794728-796473	hypothetical protein A1G_04720	Pentapeptide[pfam00805] - Repeats (8 copies) found in many cyanobacteria	6.05e-06	-1.72	-2.05
ref NC_009882.1_:c871627-869777	hypothetical protein A1G_05165	ANK[cd00204] - ankyrin repeats	4.60e-03	-2.90	-2.95
ref NC_009882.1_:1020437-1020736	hypothetical protein A1G_06100	SpoT[COG0317] - Guanosine polyphosphate pyrophosphohydrolases/synthetases	2.71e-16	-2.96	-1.56
ref NC_009882.1_:1115303-1116967	hypothetical protein A1G_06690	AdoMet_MTases[cd02440] - S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases, class I	2.02e-18	-2.72	-2.28
ref NC_009882.1_:1250262-1250714	hypothetical protein A1G_07480	SNF2_assoc super family[cl07173] - Bacterial SNF2 helicase associated	9.57e-03	-3.02	-2.21

Table S4. Genes encoding proteins with annotated function modulated by blood-feeding.

Gene ID	CDS	Annotation	COG	Fold change	
				Biological replicate 1	Biological replicate 2
A1G_00160	ref NC_009882.1_:c29202-28708	F0F1 ATP synthase subunit B	COG0711C	1.70	1.94
A1G_00175	ref NC_009882.1_:c30842-30114	F0F1 ATP synthase subunit A	COG0356C	2.30	2.39
A1G_00430	ref NC_009882.1_:c64387-64584	site-specific DNA methylase	COG0270L	1.78	2.08
A1G_00635	ref NC_009882.1_:c102248-100851	NAD(p) transhydrogenase subunit beta	COG1282C	1.89	1.80
A1G_00785	ref NC_009882.1_:c131143-131006	50S ribosomal protein L28	-	1.77	1.77
A1G_01205	ref NC_009882.1_:c225568-225900	DNA-binding protein HU	COG0776L	3.09	3.48
A1G_01215	ref NC_009882.1_:c227060-228409	signal recognition particle protein	COG0541U	1.64	1.62
A1G_01495	ref NC_009882.1_:c269892-269554	ferredoxin	COG0633C	2.30	2.09
A1G_01525	ref NC_009882.1_:c275087-275395	glutaredoxin 3	COG0695O	3.12	2.23
A1G_02025	ref NC_009882.1_:c360525-360845	putative monovalent cation/H ⁺ antiporter subunit G	COG1320P	2.04	1.66
A1G_02035	ref NC_009882.1_:c361975-362622	heme exporter protein B	-	1.53	1.76
A1G_02200	ref NC_009882.1_:c388743-388408	putative monovalent cation/H ⁺ antiporter subunit C	COG1006P	2.00	2.14
A1G_02205	ref NC_009882.1_:c389574-388822	virB9 protein	COG3504U	2.42	2.35
A1G_02210	ref NC_009882.1_:c390274-389576	virB8 protein	COG3736U	2.23	1.93
A1G_02230	ref NC_009882.1_:c392342-393790	virB10 protein	COG2948U	1.69	1.76
A1G_02235	ref NC_009882.1_:c393787-394791	type IV secretion system ATPase VirB11	COG0630NU	1.70	1.66
A1G_02240	ref NC_009882.1_:c394925-396700	type IV secretion system component VirD4	COG3505U	1.72	1.94
A1G_02290	ref NC_009882.1_:c406315-403655	DNA mismatch repair protein MutS	COG0249L	1.70	1.76
A1G_02555	ref NC_009882.1_:c450224-449622	thioredoxin peroxidase 1	COG0450O	1.59	1.75
A1G_02595	ref NC_009882.1_:c455319-456344	capD protein	COG1086MG	1.54	1.63
A1G_02600	ref NC_009882.1_:c456337-457470	putative UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	COG0381M	1.65	1.77
A1G_02690	ref NC_009882.1_:c477545-477787	exodeoxyribonuclease VII small subunit	COG1722L	1.64	2.91
A1G_03140	ref NC_009882.1_:c552178-551231	cytochrome c oxidase polypeptide II	COG1622C	1.54	1.58
A1G_03350	ref NC_009882.1_:c587602-588060	SsrA-binding protein	COG0691O	2.12	2.06
A1G_03685	ref NC_009882.1_:c634696-635682	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	COG0208F	1.61	1.71
A1G_03930	ref NC_009882.1_:c676576-677049	translation initiation factor IF-3	COG0290J	1.84	1.86
A1G_03935	ref NC_009882.1_:c677195-678433	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	COG0508C	1.52	1.54
A1G_03945	ref NC_009882.1_:c679794-681557	single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ	COG0608L	1.50	1.76
A1G_04575	ref NC_009882.1_:c772880-773593	DNA repair protein RecO	COG1381L	1.65	2.16
A1G_05475	ref NC_009882.1_:c923789-923442	50S ribosomal protein L18	COG0256J	1.77	2.39
A1G_05485	ref NC_009882.1_:c924745-924347	30S ribosomal protein S8	COG0096J	1.66	1.94
A1G_05670	ref NC_009882.1_:c952076-952858	exodeoxyribonuclease III	COG0708L	1.59	1.76
A1G_06385	ref NC_009882.1_:c1054896-1055495	phosphatidylglycerophosphatase A	COG1267I	2.16	1.75
A1G_06495	ref NC_009882.1_:c1074289-1075014	3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	COG1028IQR	1.57	1.54
A1G_06605	ref NC_009882.1_:c1093598-1093933	S-adenosylmethionine synthetase	COG0192H	2.01	2.13
A1G_06640	ref NC_009882.1_:c1099203-1095658	DNA polymerase III subunit alpha	COG0587L	1.73	1.73
A1G_06655	ref NC_009882.1_:c1103534-1105075	ampG protein	-	1.60	1.63
A1G_06670	ref NC_009882.1_:c1107497-1109929	virB4 protein precursor	COG3451U	2.10	2.08
A1G_06740	ref NC_009882.1_:c1127546-1125516	NADH dehydrogenase subunit G	COG1034C	1.67	1.66
A1G_06750	ref NC_009882.1_:c1130695-1128059	aconitate hydratase	COG1048C	2.21	1.97

Table S4 (continued).

Gene ID	CDS	Annotation	COG	Fold change	
				Biological replicate 1	Biological replicate 2
A1G_00015	ref NC_009882.1_:1409-2158	O-antigen export system ATP-binding protein RfbE	COG1134GM	-1.76	-1.63
A1G_00025	ref NC_009882.1_:2932-6033	putative bifunctional glutamate synthase subunit beta/2-polyprenylphenol hydroxylase	COG0493ER	-1.60	-1.54
A1G_00080	ref NC_009882.1_:12813-13808	nifR3-like protein	COG0042J	-1.66	-1.71
A1G_00200	ref NC_009882.1_:34713-34922	recombination protein F	-	-1.55	-1.64
A1G_00295	ref NC_009882.1_:45976-46317	cell surface antigen-like protein Sca10	-	-2.39	-2.27
A1G_00390	ref NC_009882.1_:c57026-55992	putative DNA-binding/iron metalloprotein/AP endonuclease	COG0533O	-2.45	-2.22
A1G_00395	ref NC_009882.1_:c58403-57210	acyl-CoA desaturase 1	COG1398I	-2.13	-1.64
A1G_00515	ref NC_009882.1_:75811-77307	ADP,ATP carrier protein	COG3202C	-2.20	-2.41
A1G_00520	ref NC_009882.1_:77503-78798	glycerol-3-phosphate transporter	COG2271G	-1.62	-1.83
A1G_00525	ref NC_009882.1_:78823-79245	nucleoside diphosphate kinase	COG0105F	-1.69	-1.81
A1G_00530	ref NC_009882.1_:79249-81117	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme GidA	COG0445D	-2.04	-1.81
A1G_00575	ref NC_009882.1_:c88344-88012	Iron-sulfur cluster assembly accessory protein	COG0316S	-2.58	-2.68
A1G_00680	ref NC_009882.1_:114829-115716	30S ribosomal protein S2	COG0052J	-2.62	-2.29
A1G_00685	ref NC_009882.1_:115915-116844	elongation factor Ts	COG0264J	-1.79	-1.78
A1G_00800	ref NC_009882.1_:132498-133136	ribosome biogenesis GTP-binding protein YsxC	COG0218R	-3.11	-2.61
A1G_00805	ref NC_009882.1_:133207-134007	acetylglutamate kinase	COG0548E	-2.32	-1.75
A1G_00810	ref NC_009882.1_:134020-134307	type IV secretion system protein VirB3	COG3702U	-2.07	-1.89
A1G_00880	ref NC_009882.1_:155386-155802	50S ribosomal protein L19	COG0335J	-2.44	-1.88
A1G_00920	ref NC_009882.1_:161909-162601	tRNA/rRNA methyltransferase	COG0565J	-1.95	-1.79
A1G_00945	ref NC_009882.1_:165322-166362	protease activity modulator HflK	COG0330O	-1.58	-1.60
A1G_01390	ref NC_009882.1_:256639-257463	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-carboxylate N-succinyltransferase	COG2171E	-1.71	-1.56
A1G_01440	ref NC_009882.1_:266435-266578	cell surface antigen-like protein Sca8	-	-5.66	-5.15
A1G_01445	ref NC_009882.1_:262509-262940	cell surface antigen-like protein Sca8	-	-4.06	-3.50
A1G_01475	ref NC_009882.1_:263261-263530	cell surface antigen-like protein Sca8	-	-6.15	-7.11
A1G_01595	ref NC_009882.1_:283754-284281	peptide deformylase	COG0242J	-2.32	-1.94
A1G_01600	ref NC_009882.1_:284293-285189	methionyl-tRNA formyltransferase	COG0223J	-1.93	-2.00
A1G_01640	ref NC_009882.1_:c295786-294017	multidrug resistance ABC transporter ATP-binding protein	COG1132V	-1.64	-1.65
A1G_01670	ref NC_009882.1_:299495-300343	beta 1,4 glucosyltransferase	COG0463M	-3.08	-2.15
A1G_01675	ref NC_009882.1_:300420-301658	mitochondrial protease	COG0612R	-2.34	-1.83
A1G_01680	ref NC_009882.1_:301812-302522	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	COG0152F	-1.93	-1.62
A1G_01995	ref NC_009882.1_:c357123-355294	GTP-binding protein	COG1217T	-2.23	-2.16
A1G_02095	ref NC_009882.1_:c370213-369356	peptide chain release factor 2	COG1186J	-1.57	-1.76
A1G_02170	ref NC_009882.1_:c384629-383091	putative monovalent cation/H+ antiporter subunit D	COG0651CP	-1.63	-2.04
A1G_02680	ref NC_009882.1_:c474839-474342	16S rRNA-processing protein RimM	COG0806J	-2.18	-1.93
A1G_02785	ref NC_009882.1_:487702-488622	site-specific tyrosine recombinase XerD	COG4974L	-2.52	-2.87
A1G_02825	ref NC_009882.1_:496734-497573	ABC transporter permease protein	COG4120R	-1.84	-1.95
A1G_02830	ref NC_009882.1_:497570-498292	putative ABC transporter ATP-binding protein	COG1101R	-1.79	-2.34
A1G_03010	ref NC_009882.1_:525371-525985	Holliday junction DNA helicase RuvA	COG0632L	-3.83	-3.52
A1G_03025	ref NC_009882.1_:526978-528006	Holliday junction DNA helicase RuvB	COG2255L	-1.53	-1.63
A1G_03150	ref NC_009882.1_:554615-555154	lipoprotein signal peptidase	COG0597MU	-2.65	-2.19

Table S4 (continued).

Gene ID	CDS	Annotation	COG	Fold change	
				Biological replicate 1	Biological replicate 2
A1G_03160	ref NC_009882.1_:555741-557243	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase	COG0771M	-1.88	-1.66
A1G_03165	ref NC_009882.1_:557375-558508	cell division protein FtsW	COG0772D	-2.31	-2.00
A1G_03170	ref NC_009882.1_:558505-559635	undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N- acetylglucosaminyltransferase	COG0707M	-1.65	-1.54
A1G_03250	ref NC_009882.1_:c568298-567279	capM protein	COG0438M	-3.43	-2.99
A1G_03280	ref NC_009882.1_:571571-572620	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha	COG0016J	-1.52	-1.50
A1G_03780	ref NC_009882.1_:651005-652540	tRNA pseudouridine synthase B	COG0130J	-1.90	-1.96
A1G_04070	ref NC_009882.1_:c698126-696873	ampG protein	COG2271G	-2.05	-1.66
A1G_04075	ref NC_009882.1_:c698615-698370	transposase	-	-2.44	-2.34
A1G_04275	ref NC_009882.1_:c729262-728207	porphobilinogen deaminase	COG0181H	-4.57	-6.30
A1G_04285	ref NC_009882.1_:c730629-730501	Na+/proline symporter and signal transduction histidine kinase	-	-6.29	-5.12
A1G_04290	ref NC_009882.1_:c731081-730683	two-component sensor histidine kinase	COG2205T	-6.91	-5.17
A1G_04835	ref NC_009882.1_:c813871-813740	type I site-specific restriction-modification system, R (restriction) subunit	-	-2.28	-1.84
A1G_05020	ref NC_009882.1_:845765-845917	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	-	-2.09	-2.68
A1G_05095	ref NC_009882.1_:991314-992378	bicyclomycin resistance protein	-	-4.62	-3.16
A1G_05210	ref NC_009882.1_:c881085-879286	nitrogen regulation protein ntrY	COG5000T	-2.10	-2.52
A1G_05315	ref NC_009882.1_:c901984-901727	chaperonin GroEL	-	-1.53	-1.88
A1G_05620	ref NC_009882.1_:c941865-940801	ampG protein	-	-2.43	-1.96
A1G_05625	ref NC_009882.1_:c943449-942217	ATP-dependent RNA helicase RhlE	COG0513LKJ	-2.98	-2.49
A1G_05635	ref NC_009882.1_:c946479-945574	dimethyladenosine transferase	COG0030J	-3.61	-2.68
A1G_05925	ref NC_009882.1_:c985898-984621	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	COG1219O	-1.87	-1.62
A1G_05935	ref NC_009882.1_:c987336-986650	trans-regulatory protein ExsB	COG0603R	-2.76	-3.02
A1G_05960	ref NC_009882.1_:c862507-862325	bicyclomycin resistance protein	COG2814G	-1.87	-1.58
A1G_06065	ref NC_009882.1_:c1013060-1012188	lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	COG1560M	-2.51	-2.19
A1G_06070	ref NC_009882.1_:c1014000-1013035	tetraacyldisaccharide 4'-kinase	COG1663M	-3.18	-2.98
A1G_06075	ref NC_009882.1_:c1014858-1014004	putative periplasmic protein	COG0739M	-3.36	-4.04
A1G_06135	ref NC_009882.1_:c1024825-1024376	ABC transporter substrate binding protein	COG1463Q	-1.70	-1.56
A1G_06145	ref NC_009882.1_:c1025600-1025133	ribonuclease H	COG0328L	-2.08	-1.82
A1G_06170	ref NC_009882.1_:1029038-1029760	surfeit locus protein 1	COG3346S	-2.18	-2.05
A1G_06265	ref NC_009882.1_:1040765-1042162	ADP,ATP carrier protein	COG3202C	-1.91	-2.02
A1G_06400	ref NC_009882.1_:1056470-1057675	aspartate kinase	COG0527E	-1.87	-1.77
A1G_06435	ref NC_009882.1_:c1061573-1060332	proline/betaine transporter	-	-3.11	-2.65
A1G_06705	ref NC_009882.1_:1117766-1118383	NADH dehydrogenase subunit J	COG0839C	-2.11	-1.93
A1G_06710	ref NC_009882.1_:1118376-1118690	NADH dehydrogenase subunit K	COG0713C	-4.59	-3.56
A1G_06715	ref NC_009882.1_:1118690-1120663	NADH dehydrogenase subunit L	COG1009CP	-1.97	-1.54
A1G_07355	ref NC_009882.1_:c1234383-1234144	antitoxin of toxin-antitoxin system StbD	COG2161D	-3.32	-2.82
A1G_07375	ref NC_009882.1_:1236834-1237097	DNA-damage-inducible protein J	COG3077L	-1.98	-1.82
A1G_07380	ref NC_009882.1_:1237189-1237332	addiction module toxin, RelE/StbE family protein	COG3041S	-3.13	-2.62
A1G_07400	ref NC_009882.1_:c1240365-1239220	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	COG0624E	-2.61	-2.18

Table S5. Hypothetical protein encoding genes differentially expressed by blood feeding.

CDS	Annotation	Domain identified by conserved domain analysis	Fold change		
			E-Value	Biological replicate 1	Biological replicate 2
ref NC_009882.1:c32054-31221	hypothetical protein A1G_00185	pfam13462 - Thioredoxin	9.74e-56	2.13	1.92
ref NC_009882.1:c43779-43210	hypothetical protein A1G_00270	COG1678 - Putative transcriptional regulator	2.36e-80	1.54	1.85
ref NC_009882.1:c58861-58682	hypothetical protein A1G_00400	HTH super family[cl00088] - Helix-turn-helix domains	5.69e-09	1.84	1.90
ref NC_009882.1:c96803-95487	hypothetical protein A1G_00605	Porin_4[pfam13609], Gram-negative porin	3.11e-17	2.76	2.62
ref NC_009882.1:c103121-102387	hypothetical protein A1G_00640	OmpW[COG3047], Outer membrane protein W	1.89e-48	1.84	1.81
ref NC_009882.1:c122272-122108	hypothetical protein A1G_00715	PhdYeFM_antitox[pfam02604], Antitoxin Phd_YeFM, type II toxin-antitoxin system	1.12e-14	1.88	2.30
ref NC_009882.1:c122409-123413	hypothetical protein A1G_00720	TPR[cd00189] - Tetratricopeptide repeat domain	1.58e-06	1.53	2.07
ref NC_009882.1:c191555-190416	hypothetical protein A1G_01045	RPE1[TIGR01045] - Rickettsial palindromic element RPE1 domain	1.61e-18	1.83	2.15
ref NC_009882.1:c221811-221575	hypothetical protein A1G_01195	No conserved domains identified		1.91	2.38
ref NC_009882.1:c245095-244994	hypothetical protein A1G_01325	ChaB super family[cl01887] -ChaB	4.71e-12	1.99	1.99
ref NC_009882.1:c255227-255586	hypothetical protein A1G_01380	VirB2[COG3838] - Type IV secretory pathway, VirB2 components (pilins)	2.17e-21	2.69	2.73
ref NC_009882.1:c268466-267525	hypothetical protein A1G_01485	Imp[COG2358] - TRAP-type uncharacterized transport system, periplasmic component	1.77e-111	1.56	1.66
ref NC_009882.1:c269541-268471	hypothetical protein A1G_01490	MopB_Res-Cmplx1_Nad11-M[cd02774] - Mitochondrial-encoded NADH-quinone oxidoreductase/respiratory complex I	9.49e-05	2.16	2.12
ref NC_009882.1:c283121-283303	hypothetical protein A1G_01585	HIG_1_N[pfam04588] - Hypoxia induced protein conserved region	2.52e-06	1.83	1.91
ref NC_009882.1:c312257-312475	hypothetical protein A1G_01755	No conserved domain identified		2.92	2.02
ref NC_009882.1:c390739-390918	hypothetical protein A1G_02215	No conserved domain identified		2.05	2.15
ref NC_009882.1:c421714-421487	hypothetical protein A1G_02385	No conserved domain identified		3.76	3.45
ref NC_009882.1:c436964-437104	hypothetical protein A1G_02475	PDDEKX_2 super family[cl15088] - PD-(D/E)XK nuclease family transposase	8.12e-06	1.50	1.72
ref NC_009882.1:c551038-550655	hypothetical protein A1G_03135	LbH_XAT[cd03349] - Xenobiotic acyltransferase (XAT)	1.25e-09	1.68	1.72
ref NC_009882.1:c609991-610131	hypothetical protein A1G_03495	COG3956 - Protein containing tetrapyrrole methyltransferase domain and MazG-like (predicted pyrophosphatase) domain	4.87e-03	1.91	2.71
ref NC_009882.1:c634212-634331	hypothetical protein A1G_03675	No conserved domain identified		1.82	2.18
ref NC_009882.1:c741051-740596	hypothetical protein A1G_04350	No conserved domain identified		1.59	1.61
ref NC_009882.1:c782754-783182	hypothetical protein A1G_04620	HTH super family[cl00088] - Helix-turn-helix domains	4.82e-39	2.12	1.70
ref NC_009882.1:c789805-789605	hypothetical protein A1G_04675	No conserved domain identified		2.09	1.59
ref NC_009882.1:c790607-790365	hypothetical protein A1G_04690	Flu_M2 super family[cl02903] - Influenza Matrix protein (M2)	2.90e-03	1.88	2.01
ref NC_009882.1:c791063-790797	hypothetical protein A1G_04700	No conserved domain identified		2.15	2.31
ref NC_009882.1:c838905-839507	hypothetical protein A1G_04970	No conserved domain identified		1.84	1.73
ref NC_009882.1:c889260-889108	hypothetical protein A1G_05260	No conserved domain identified		3.23	2.25
ref NC_009882.1:c913327-913094	hypothetical protein A1G_05400	GAS[pfam13851] - Growth-arrest specific micro-tubule binding	4.10e-03	1.90	2.36
ref NC_009882.1:c951876-952079	hypothetical protein A1G_05665	No conserved domain identified		1.92	1.96
ref NC_009882.1:c994684-996585	hypothetical protein A1G_05975	ULP1[COG5160] - Protease, Ulp1 family	4.27e-04	1.61	1.95
ref NC_009882.1:c1051294-1051470	hypothetical protein A1G_06350	COG5510 - Predicted small secreted protein	4.88e-15	4.12	3.01
ref NC_009882.1:c1062928-1062575	hypothetical protein A1G_06455	HTH_25[pfam13413] - Helix-turn-helix domain	1.10e-20	2.06	1.61
ref NC_009882.1:c1071820-1071686	hypothetical protein A1G_06480	PRK14995[PRK14995] - methyl viologen resistance protein SmvA	4.84e-04	1.88	2.08
ref NC_009882.1:c1072517-1072290	hypothetical protein A1G_06485	No conserved domain identified		1.55	1.85
ref NC_009882.1:c1079986-1080216	hypothetical protein A1G_06525	No conserved domain identified		2.14	2.08
ref NC_009882.1:c1100886-1103396	hypothetical protein A1G_06650	AsmA_2[pfam13502] - AsmA-like C-terminal region	2.31e-07	1.75	2.04
ref NC_009882.1:c1127890-1127534	hypothetical protein A1G_06745	COG3671[COG3671] - Predicted membrane protein	3.91e-67	2.94	2.69
ref NC_009882.1:c1233873-1233787	hypothetical protein A1G_07345	Transpeptidase super family[cl01009] - Penicillin binding protein transpeptidase domain	1.05e-05	1.96	2.10
ref NC_009882.1:c1250262-1250714	hypothetical protein A1G_07480	SNF2_assoc super family[cl07173] - Bacterial SNF2 helicase associated	9.57e-03	2.41	2.62
ref NC_009882.1:c1462530-461532	hypothetical protein A1G_02620	AcrA[COG0845] - Membrane-fusion protein	1.20e-31	-1.75	-1.67
ref NC_009882.1:c6316-6077	hypothetical protein A1G_00030	MazF[COG2337] - Growth inhibitor	4.40e-15	-2.39	-2.17
ref NC_009882.1:c13826-14749	hypothetical protein A1G_00085	CE4_RC0012_like[cd10963] - Putative catalytic NodB homology domain of uncharacterized protein from <i>Rickettsia conorii</i>	8.64e-114	-1.98	-1.68
ref NC_009882.1:c32218-32739	hypothetical protein A1G_00190	COG1329 - Transcriptional regulators, similar to M xanthus CarD	2.39e-72	-2.88	-2.59
ref NC_009882.1:c87774-87914	hypothetical protein A1G_00570	No conserved domain identified		-1.64	-1.9
ref NC_009882.1:c100796-100236	hypothetical protein A1G_00630	No conserved domain identified		-2.16	-1.79
ref NC_009882.1:c117318-117707	hypothetical protein A1G_00690	No conserved domain identified		-1.85	-2.37
ref NC_009882.1:c137058-140018	hypothetical protein A1G_00820	VirB6[COG3704] 33499 no Type IV secretory pathway, VirB6 components	3.76e-101	-1.88	-1.78
ref NC_009882.1:c140005-141990	hypothetical protein A1G_00825	VirB6[COG3704] - Type IV secretory pathway, VirB6 components	9.75e-103	-1.77	-1.59
ref NC_009882.1:c199098-196984	hypothetical protein A1G_01070	polC[PRK00448], DNA polymerase III PolC; Validated	5.33e-03	-1.65	-1.69

Table S5 (continued).

CDS	Annotation	Domain identified by conserved domain analysis	Fold change		
			E-Value	Biological replicate 1	Biological replicate 2
ref NC_009882.1_:210439-210642	hypothetical protein A1G_01135	DUF2674[pfam10879] - Protein of unknown function (DUF2674)	2.24e-46	-1.96	-1.89
ref NC_009882.1_:263542-263811	hypothetical protein A1G_01450	No conserved domain identified		-5.74	-5.90
ref NC_009882.1_:c264827-264525	hypothetical protein A1G_01455	No conserved domain identified		-4.24	-3.88
ref NC_009882.1_:285406-285849	hypothetical protein A1G_01605	No conserved domain identified		-2.76	-2.19
ref NC_009882.1_:289631-290197	hypothetical protein A1G_01610	No conserved domain identified		-1.89	-1.69
ref NC_009882.1_:333307-333474	hypothetical protein A1G_01880	No conserved domain identified		-2.49	-2.64
ref NC_009882.1_:c333827-333624	hypothetical protein A1G_01885	No conserved domain identified		-1.89	-2.03
ref NC_009882.1_:c346202-345054	hypothetical protein A1G_01945	AgrB super family[cl01873] - Accessory gene regulator B	8.85e-04	-1.87	-1.52
ref NC_009882.1_:384409-384507	hypothetical protein A1G_02175	PRK06588[PRK06588] - putative monovalent cation/H+ antiporter subunit D	3.48e-23	-2.47	-2.76
ref NC_009882.1_:c413519-412539	hypothetical protein A1G_02330	Nucleotid_trans super family[cl05288] - Nucleotide-diphospho-sugar transferase	7.40e-04	-2.91	-2.84
ref NC_009882.1_:c439531-439259	hypothetical protein A1G_02495	flgK_ends[TIGR02492] - flagellar hook-associated protein FlgK	9.61e-03	-2.35	-1.81
ref NC_009882.1_:495812-496729	hypothetical protein A1G_02820	COG2984 - ABC-type uncharacterized transport system, periplasmic component	1.35e-97	-1.66	-1.94
ref NC_009882.1_:c498787-498383	hypothetical protein A1G_02835	No conserved domain identified		-3.73	-3.82
ref NC_009882.1_:c499229-498807	hypothetical protein A1G_02840	ANK[cd00204] - ankyrin repeats	1.50e-08	-3.3	-2.77
ref NC_009882.1_:524000-524968	hypothetical protein A1G_03000	Fic[pfam02661] - Fic/DOC family	2.07e-22	-8.32	-6.07
ref NC_009882.1_:525229-525366	hypothetical protein A1G_03005	No conserved domain identified		-8.16	-5.32
ref NC_009882.1_:526267-526467	hypothetical protein A1G_03015	No conserved domain identified		-3.53	-2.48
ref NC_009882.1_:c533894-533406	hypothetical protein A1G_03050	BON[pfam04972] - BON domain	3.58e-13	-3.04	-2.31
ref NC_009882.1_:c535744-534896	hypothetical protein A1G_03065	FTR1[pfam03239] - Iron permease FTR1 family;	9.12e-60	-2.81	-2.05
ref NC_009882.1_:c536134-535754	hypothetical protein A1G_03070	Cupredoxin_1[pfam13473] - Cupredoxin-like domain	5.13e-37	-2.20	-1.73
ref NC_009882.1_:c537320-536325	hypothetical protein A1G_03075	FKBP_C[pfam00254] - FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	4.61e-07	-3.65	-2.43
ref NC_009882.1_:561253-561429	hypothetical protein A1G_03195	No conserved domain identified		-1.54	-1.72
ref NC_009882.1_:726966-727136	hypothetical protein A1G_04250	PHA00670 super family[cl17051] - hypothetical protein	3.74e-05	-2.08	-2.15
ref NC_009882.1_:c727231-727037	hypothetical protein A1G_04255	DUF4143[pfam13635] - Domain of unknown function (DUF4143)	1.37e-06	-3.02	-2.67
ref NC_009882.1_:c727442-727242	hypothetical protein A1G_04260	DUF4143[pfam13635] - Domain of unknown function (DUF4143)	1.50e-17	-4.51	-3.61
ref NC_009882.1_:c727681-727544	hypothetical protein A1G_04265	No conserved domain identified		-7.60	-8.08
ref NC_009882.1_:c727818-727639	hypothetical protein A1G_04270	P-loop_NTPase super family[cl09099] - P-loop containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases	6.62e-03	-6.03	-7.16
ref NC_009882.1_:c730245-729259	hypothetical protein A1G_04280	Peptidase_S66[cd07025] - LD-Carboxypeptidase, a serine protease	9.72e-51	-7.85	-6.86
ref NC_009882.1_:c733692-733087	hypothetical protein A1G_04305	ANK[cd00204] - ankyrin repeats	6.67e-06	-4.91	-3.82
ref NC_009882.1_:767346-770225	hypothetical protein A1G_04555	Pentapeptide[pfam00805] - Pentapeptide repeats (8 copies)	1.99e-06	-1.66	-1.72
ref NC_009882.1_:774111-774803	hypothetical protein A1G_04585	COG1214[COG1214] - Inactive homolog of metal-dependent proteases, putative molecular chaperone	5.47e-58	-3.52	-3.13
ref NC_009882.1_:c814522-814355	hypothetical protein A1G_04840	No conserved domain identified		-2.08	-1.74
ref NC_009882.1_:c846798-845314	hypothetical protein A1G_05015	No conserved domain identified		-2.05	-1.98
ref NC_009882.1_:c868072-867395	hypothetical protein A1G_05140	Radical_SAM[cd01335] - Radical SAM superfamily	8.62e-06	-2.16	-2.39
ref NC_009882.1_:875046-875333	hypothetical protein A1G_05190	No conserved domain identified		-6.27	-4.46
ref NC_009882.1_:c875454-875305	hypothetical protein A1G_05195	No conserved domain identified		-7.99	-4.45
ref NC_009882.1_:c947519-946632	hypothetical protein A1G_05640	SurA_N_3 super family[cl07813] - SurA N-terminal domain	2.06e-12	-2.38	-1.81
ref NC_009882.1_:983971-984123	hypothetical protein A1G_05920	DUF2269[pfam10027] - Predicted integral membrane protein (DUF2269)	2.72e-13	-2.36	-2.02
ref NC_009882.1_:c987677-987333	hypothetical protein A1G_05940	HicB[pfam05534] - bacterial HicB family of proteins	3.58e-16	-2.81	-2.59
ref NC_009882.1_:992452-993807	hypothetical protein A1G_05965	MacB_PCD[pfam12704] - MacB-like periplasmic core domain	1.44e-23	-2.76	-2.23
ref NC_009882.1_:c1015646-1014858	hypothetical protein A1G_06080	DUF519[pfam04378] - Protein of unknown function (DUF519) possibly secreted	3.00e-116	-4.90	-4.13
ref NC_009882.1_:c1026073-1025600	hypothetical protein A1G_06150	No conserved domain identified		-1.98	-1.79
ref NC_009882.1_:1043231-1043452	hypothetical protein A1G_06275	COG4100 - Cystathionine beta-lyase family protein involved in aluminum resistance	6.60e-03	-1.66	-1.67
ref NC_009882.1_:c1050287-1049916	hypothetical protein A1G_06330	ycf1[CHL00204] - Ycf1, Provisional	7.56e-05	-2.86	-2.52
ref NC_009882.1_:c1050466-1050275	hypothetical protein A1G_06335	No conserved domain identified		-4.30	-3.32
ref NC_009882.1_:c1052108-1051542	hypothetical protein A1G_06355	PDDEXK_2[pfam12784] - PD-(D/E)XK nuclease family transposase	1.29e-23	-2.72	-2.05
ref NC_009882.1_:1117305-1117733	hypothetical protein A1G_06700	TH_XRE[cd00093], Helix-turn-helix XRE-family like proteins	5.36e-08	-2.95	-2.28
ref NC_009882.1_:c1164928-1163354	hypothetical protein A1G_06985	Rotamase_2[pfam13145], PPII-type PPIASE domain	4.55e-11	-2.01	-1.66
ref NC_009882.1_:c1175920-1175135	hypothetical protein A1G_07015	COG1835 - Predicted acyltransferases	2.38e-18	-1.71	-1.88
ref NC_009882.1_:c1193675-1193313	hypothetical protein A1G_07135	No conserved domain identified		-4.88	-3.92
ref NC_009882.1_:1237534-1238550	hypothetical protein A1G_07385	YjgP_YjgQ[pfam03739] - Predicted permease YjgP/YjgQ family	1.11e-59	-2.28	-1.94
ref NC_009882.1_:c1241293-1241123	hypothetical protein A1G_07410	No conserved domain identified		-1.93	-2.03
ref NC_009882.1_:c1241821-1241363	hypothetical protein A1G_07415	HsdM[COG0286] - Type I restriction-modification system methyltransferase subunit	1.34e-17	-2.43	-2.29