

CAMILA DANTAS MALOSSI

Efeitos da infecção por *Rickettsia rickettsii* sobre o perfil de expressão gênica do carrapato vetor *Amblyomma aureolatum*

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

São Paulo
2013

CAMILA DANTAS MALOSSI

Efeitos da infecção por *Rickettsia rickettsii* sobre o perfil de expressão gênica do carrapato vetor *Amblyomma aureolatum*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre 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

Malossi, Camila Dantas.

Efeitos da infecção por *Rickettsia rickettsii* sobre o perfil da expressão gênica do carrapato vetor *Amblyomma aureolatum* / Camila Dantas Malossi. – São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Cristina Fogaça.

Dissertação (Mestrado) – 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-riquétsia.

Versão do título para o inglês: Effects of the infection with *Rickettsia rickettsii* on the gene expression profile of the tick vector *Amblyomma aureolatum*.

1. Transcriptoma 2. Hibridação subtrativa por supressão 3. RNA de interferência 4. Carrapato 5. *Amblyomma aureolatum* 6. *Rickettsia rickettsii* I. Fogaça, Profa. Dra. Andrea Cristina II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0171/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Profa. Dra. Camila Dantas Malossi.

Título da Efeitos da infecção por *Rickettsia rickettsii* sobre o perfil da
expressão gênica do carrapato vetor *Amblyomma
aureolatum*.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

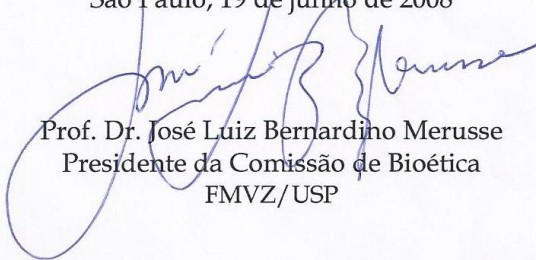


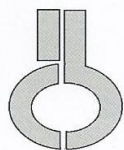
CERTIFICADO

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

À minha mãe e minha irmã pela presença e apoio
em todos os momentos. Ao Luis por me fazer
acreditar que eu era capaz.

AGRADECIMENTOS

À Professora Andrea Cristina Fogaça, por seus ensinamentos tanto profissionais como pessoais, pela dedicação, carinho e entusiasmo em todo o trabalho. E, além de tudo, ser minha mãe “biológica” no mundo científico.

À Maria Fernanda Galletti, por ser minha segunda orientadora e me transmitir tanto conhecimento como ensinamentos que levarei por toda a minha vida. Obrigada pela paciência.

À Larissa Martins, que completou o grupo “Rick” e compartilhou comigo tantos momentos de experiências, seja madrugada a fora, seja finais de semana, seja feriados. Obrigada por estar ali para auxiliar a qualquer momento com sua presença e ideias, Lari.

A todos do Laboratório de Bioquímica e Imunologia de Artrópodes que tantas vezes me auxiliaram, deram suporte e sorriram para mim em todos os momentos do meu mestrado: Paula Pohl, Thays Biffano, Sandra Kalil, Janaína Peixoto, Rafael Rosa, Eliane Esteves, Mario Balanco, Gustavo Zoppello...

À Professora Sirlei Daffre, pelas ideias e auxílio durante todo o trabalho.

Ao Professor Marcelo Labruna, pela disposição em ajudar sempre e todo o auxílio com os experimentos envolvendo os carrapatos, sem os quais este trabalho não seria realizado.

A todos do VPS que me acolheram e auxiliaram no experimento *in vivo*, com um abraço mais que especial para o João, Chico, Pedrinho, Marcos, Hebert, Tati e todos aqueles que também paravam o que quer que seja para nos ajudar. Obrigada a todos.

Ao Adriano Pinter, que mais do que trocar experiências e ideias, sempre se mostrou prestativo para qualquer experimento a realizar e nos possibilitou que tudo fosse terminado a tempo.

Ao Professor Arthur Gruber e ao Thibério, por toda análise de bioinformática que nos possibilitou dar continuidade a esse projeto.

A todos os alunos e docentes do Instituto de Ciências Biomédicas II pelas horas de convívio em disciplina e experimentos, bem auxílio em qualquer problema que eu tivesse.

À toda equipe do Instituto de Ciências Biomédicas II pelo apoio logístico e administrativo para a confecção dessa dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio.

Ao Professor João Pessoa Araújo Jr que me liberou tantas vezes para vir a São Paulo e por entender o quanto o meu mestrado é importante para mim.

A todos os meus novos colegas do Laboratório de Diagnóstico Molecular que fizeram questão de me fazer sentir em um novo lar.

A todos os meus amigos “biológicos” Ná, Mickey, Minnie, PO, Dani, Mia, Natasha, Detô, Cintia, Tama, entre outros que me apoiavam como “carrapatóloga” e me incentivaram a ponto de ganhar um customizado bichinho de pelúcia vestido de carrapato. Valeu gente!

À minha família, que suportou minha ausência e distância em mais de dois anos. Sem ter minha mão segurada com tanta confiança tantas vezes eu não teria a mesma confiança em mim mesma. Se estou aqui, é sempre por querer mostrar o meu melhor para minhas queridas mãe e irmã e estas terem orgulho de mim.

Ao meu namorado LuCa que me mostrou nesses últimos anos todo o amor, carinho e paciência que eu não esperava poder existir em uma única pessoa. Obrigada por estar comigo esse tempo sentindo orgulho de tudo o que eu faço e consigo obter.

À Lisa, que marcou minha vida de um modo indescritível e me apoiava com todos os olhares possíveis de compreensão, carinho e orgulho. Deus tem hoje uma estrela linda ao seu lado que eu tive a sorte de conviver por 17 anos.

Enfim, muito obrigada a todos que contribuíram para esse trabalho e, que mesmo que não estejam citados aqui, estão guardados em meu coração.

“Se quiser buscar realmente a verdade, é preciso que pelo menos um vez em sua vida você duvide, ao máximo que puder, de todas as coisas.”

René Descartes

RESUMO

MALLOSSI, C. D. **Efeitos da infecção por *Rickettsia rickettsii* sobre o perfil de expressão gênica do carrapato vetor *Amblyomma aureolatum***. 2013. 72 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Rickettsia rickettsii é o agente etiológico da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, a mais severa das riquetsioses. A bactéria é transmitida ao homem por diferentes espécies de carrapatos ixodídeos e no Brasil, os principais vetores são *Amblyomma cajennense* e *A. aureolatum*. Carrapatos infectados apresentam menores taxas de sobrevivência e de reprodução, sugerindo que *R. rickettsii* seja patogênica também para seus vetores. Assim, a identificação de genes diferencialmente expressos pela infecção de carrapatos por *R. rickettsii* torna-se fundamental, podendo gerar informações para o esclarecimento dos mecanismos de virulência desse patógeno. Neste trabalho, utilizamos o RNA de carrapatos *A. aureolatum* infectados ou não infectados com *R. rickettsii* para a construção de bibliotecas subtrativas de cDNA através de hibridação subtrativa por supressão (SSH). Após a análise bioinformática das sequências de nucleotídeos de preparações de plasmídeos dos clones das bibliotecas, 68 sequências únicas foram obtidas, das quais 56 representam genes com expressão induzida e 12 genes com expressão reprimida pela infecção. Após a validação dos dados por reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa (RT-qPCR), três genes foram selecionados para a caracterização funcional por RNA de interferência (RNAi): um peptídeo antimicrobiano (hebraeína), uma proteína dissulfeto isomerase (PDI) e uma proteína contendo domínio de inibidor Kunitz-*type* (monolaris). Os efeitos do silenciamento gênico sobre a aquisição e a transmissão da bactéria foram analisados, bem como os efeitos sobre o *fitness* dos carrapatos. Um maior número de carrapatos adquiriu *R. rickettsii* quando a expressão gênica da hebraeína e da PDI foi silenciada, sugerindo que ambas participam na defesa do carrapato contra a infecção. Nenhum efeito sobre a transmissão da bactéria para o hospedeiro, nem sobre o *fitness* de carrapatos foi observado pelo silenciamento de nenhum dos três genes analisados. Os dados obtidos pelo presente estudo apontaram genes importantes para a defesa do carrapato *A. aureolatum* contra *R. rickettsii*, fornecendo subsídios para uma melhor compreensão da relação carrapato-riquetsia.

Palavras-chave: Transcriptoma. Hibridação subtrativa por supressão (SSH). RNA de interferência (RNAi). Carrapato. *Amblyomma aureolatum*. *Rickettsia rickettsia*. Hebraeína. Proteína dissulfeto isomerase. Inibidor Kunitz-*type*.

ABSTRACT

MALOSSE, C. D. **Effects of the infection with *Rickettsia rickettsii* on the gene expression profile of the tick vector *Amblyomma aureolatum***. 2013. 72 p. Master's thesis (Biology of the Pathogen-Host Relationship) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Rickettsia rickettsii is the etiological agent of Rocky Mountain Spotted Fever, the most severe rickettsiosis. The bacterium is transmitted to humans by different species of ixodid ticks and in Brazil, the main vectors are *Amblyomma cajennense* and *A. aureolatum*. Infected ticks have lower rates of survival and reproduction, suggesting that *R. rickettsii* is also pathogenic for its vectors. Therefore, the identification of differentially expressed genes of ticks upon infection with *R. rickettsii* is fundamental and may generate information for the elucidation of the mechanisms of virulence of this pathogen. In this work, we have used the RNA of ticks *A. aureolatum* infected or not with *R. rickettsii* to construct cDNA libraries by suppression subtractive hybridization (SSH). After the bioinformatic analysis of nucleotide sequences of preparations of plasmids from library clones, 68 unique sequences were obtained, among which 56 represent genes up-regulated and 12 genes down-regulated by infection. After data validation by quantitative polymerase chain reaction preceded by reverse transcription (RT- qPCR), three genes were selected for functional characterization by RNA interference (RNAi): an antimicrobial peptide (hebraein), a protein disulfide isomerase (PDI), and a protein containing Kunitz-type inhibitor domain (monolaris). The effects of the gene knockdown on the acquisition and transmission of the bacterium, as well as the effects on the fitness of ticks, were analyzed. A higher number of ticks acquired *R. rickettsii* when the gene expression of hebraein and PDI was silenced, suggesting that both proteins participate in the defense of the tick against infection. No effect on the transmission of the bacterium to the host or on the fitness of ticks was observed after knockdown of the three analyzed genes. Data obtained by the present study pointed out important genes for the defense of the tick *A. aureolatum* against *R. rickettsii*, providing information to better understand of the tick-rickettsia relationship.

Keywords: Transcriptome. suppression subtractive hybridization (SSH). RNA interference (RNAi). Tick. *Amblyomma aureolatum*. *Rickettsia rickettsii*. Hebraein. Protein disulfide isomerase. Kunitz-type inhibitor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>Amblyomma aureolatum</i>	22
Figura 2 - Número de riquétsias nas glândulas salivares e intestinos de fêmeas adultas.....	44
Figura 3 - Análise do perfil de expressão gênica de fêmeas adultas de <i>A. aureolatum</i> infectadas com <i>R. rickettsii</i> por RT-qPCR.....	45
Figura 4 - Análise do perfil de expressão gênica de carrapatos <i>A. aureolatum</i> machos infectados com <i>R. rickettsii</i> por RT-qPCR.....	46
Figura 5 - Quantidade de mitocôndrias por células das glândulas salivares de fêmeas de <i>A. aureolatum</i> não infectadas e infectadas com <i>R. rickettsii</i>	47
Figura 6 - Sequência de nucleotídeos do cDNA e sequência deduzida de aminoácidos da hebraína (A), da PDI (B) e da proteína com domínio Kunitz-type (C).....	48
Figura 7 - Alinhamento das sequências de aminoácidos predita a partir do cDNA da hebraína de <i>Amblyomma aureolatum</i> (Amblyom_a) com as sequências de <i>Amblyomma hebraeum</i> (Amblyom_h) e de <i>Amblyomma cajennense</i> (Amblyom_c).....	50
Figura 8 - Alinhamento das sequências de aminoácidos predita a partir do cDNA da PDI de <i>Amblyomma aureolatum</i> (Amblyom_a) com as sequências de <i>Amblyomma variegatum</i> (Amblyom_v), <i>Haemaphysalis longicornis</i> (Haemaphysa) e <i>Ixodes scapularis</i> (Ixodes_sca).....	51
Figura 9 - Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas do cDNA de proteínas de <i>A. aureolatum</i> com domínio Kunitz-type com sequências de outras espécies de carrapatos.....	52
Figura 10 – Número de riquétsias nas glândulas salivares dos carrapatos utilizados no experimento de transmissão.....	55
Figura 11 – Temperatura corporal dos coelhos utilizados para a alimentação de carrapatos infectados e microinjetados com dsRNA para a hebraína, PDI, proteína com domínio de inibidor Kunitz-type ou MSP1.....	56
Figura 12 - Avaliação do fitness das fêmeas ingurgitadas e silenciadas para a hebraína, PDI ou o gene controle MSP1.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Adaptadores de supressão utilizados na construção das populações <i>tester</i> das bibliotecas subtrativas de cDNA.....	22
Tabela 2 - Similaridade entre as sequências representando genes induzidos de <i>A. aureolatum</i> com expressão gênica induzida nas glândulas salivares pela infecção por <i>R. rickettsii</i> e sequências disponíveis em bancos públicos de dados.....	41
Tabela 3 - Similaridade entre as sequências representando genes reprimidos de <i>A. aureolatum</i> com expressão gênica reprimida nas glândulas salivares pela infecção por <i>R. rickettsii</i> e sequências disponíveis em bancos públicos de dados.....	43
Tabela 4 – Número de riquétsias nas glândulas salivares e intestinos dos carrapatos que adquiriram a infecção após a administração das dsRNA para a hebraeína (Heb), proteína dissulfeto isomerase (PDI), proteína com domínio de inibidor Kunitz-type (Kun25) ou MSP1 (controle).	54
Tabela 5 - Número de riquétsias em biópsias de pele de coelhos antes e após diferentes tempos do início da alimentação de carrapatos infectados.....	56
Tabela 6 - Efeitos do silenciamento na sobrevivência dos carrapatos, após a microinjeção e após a alimentação, e a média de dias para o início da postura.....	57

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

µL – microlitro

AaC – *Amblyomma aureolatum* Controle

AaI – *Amblyomma aureolatum* Infectado

cDNA – DNA complementar

COX – citocromo c oxidase

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNAg – DNA genômico

dsRNA – RNA dupla fita

EUA – Estados Unidos da América

FMB – Febre Maculosa Brasileira

GST – Glutathione S-Transferase

Heb – Hebraína Aa_20

h - horas

Kun25 – Monolares com domínio Kunitz-*type* Aa_25

M – molar

min – minutos

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – miliMolar

ng – nanograma

nL - nanolitro

nmol – nanomol

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PDI – Proteína dissulfeto isomerase Aa_26

pH – potencial hidrogeniônico

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

RMSF – Febre Maculosa das Montanhas Rochosas/ *Rocky Mountain Spotted Fever*

RNA – ácido ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

RT – Transcrição Reversa

RT-qPCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa

s – segundos

SP – São Paulo

SSH – Hibridação subtrativa por supressão

UR – umidade relativa

V – Volt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Febre maculosa, a enfermidade	18
1.2 <i>Rickettsia rickettsii</i> , o agente etiológico	19
1.3 Carrapatos vetores	20
1.4 <i>Amblyomma aureolatum</i>	21
1.5 Glândula salivar: aquisição e transmissão	23
1.6 Interações moleculares entre vetor e patógeno	24
1.7 Bibliotecas subtrativas de cDNA	26
1.8 RNA de interferência: estudo funcional de um gene e efeitos frente à infecção por patógenos em carrapatos	26
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Carrapatos e <i>Rickettsia rickettsii</i>	29
3.2 Infecção experimental de carrapatos	29
3.3 Dissecção dos carrapatos	30
3.4 Extração de DNA genômico e RNA total	30
3.5 Determinação do número de riquétsias nos tecidos dos carrapatos	30
3.6 Construção das bibliotecas subtrativas de cDNA	31
3.6.1 Síntese de cDNA e digestão com endonuclease <i>Rsa I</i>	31
3.6.2 Hibridação subtrativa por supressão (SSH) e construção das bibliotecas <i>AaC</i> e <i>AaI</i>	32
3.6.3 Análise das bibliotecas de cDNA para a identificação de clones específicos de cada biblioteca	32
3.6.4 Sequenciamento e anotação	33
3.7 Reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa (RT-qPCR)	34
3.7.1 Transcrição reversa (RT)	34
3.7.2 Reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR)	35
3.8 Determinação do número de mitocôndrias nas glândulas salivares de carrapatos	35
3.9 Sequenciamento do cDNA de genes selecionados para o silenciamento ...	36

3.10 Silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi)	37
3.10.1 Síntese de RNA dupla fita (dsRNA)	37
3.10.2 Microinjeção de dsRNA	38
3.10.3 Avaliação do nível de silenciamento gênico	38
3.10.4 Avaliação da aquisição de <i>R. rickettsii</i> pelos carrapatos e da transmissão para o hospedeiro vertebrado	39
3.10.5 Avaliação do fitness	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Bibliotecas subtrativas de cDNA	40
4.2 Validação do dados de SSH por RT-qPCR	43
4.3 Quantificação de mitocôndrias	46
4.4 Sequenciamento de nucleotídeos do cDNA da hebraeína e da proteína dissulfeto isomerase	47
4.5 Silenciamento gênico	53
5 DISCUSSÃO	59
5.1 Expressão gênica diferencial devido à infecção de <i>Rickettsia rickettsii</i> em <i>Amblyomma aureolatum</i>	59
5.2 Caracterização funcional da hebraeína (Aa_20), da proteína dissulfeto isomerase (Aa_26) e da proteína com domínio de inibidor Kunitz-type (Aa_25)	62
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Febre maculosa, a enfermidade

A Febre Maculosa das Montanhas Rochosas ou *Rocky Mountain Spotted Fever* (RMSF) é causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* e foi a primeira doença transmitida por carrapatos a ser reconhecida na América do Norte (CHEN; SEXTON, 2008). Ainda hoje, essa doença apresenta grande importância no continente Americano, ocorrendo em toda a América do Norte e em países da América Central (Costa Rica e Panamá) e da América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil e Colômbia) (CHEN; SEXTON, 2008; RAOULT; ROUX, 1997). No Brasil, o primeiro caso da doença foi descrito em 1929 por Piza no Estado de São Paulo, e mais tarde em Minas Gerais, Bahia e Rio de Janeiro (GRECA et al., 2008). Chamada de “Tifo Exantemático de São Paulo”, “Tifo Exantemático de Minas Gerais” e, finalmente, Febre Maculosa Brasileira (FMB), como assim ficou conhecida, é a mais importante doença transmitida por carrapatos no Brasil. Assim, a FMB foi incluída na Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória do Ministério da Saúde pela Portaria GM/MS nº 1.943 de 18 de outubro de 2001. De 1988 a 1997, 36 casos distribuídos em seis municípios do estado de São Paulo foram confirmados laboratorialmente. De 1998 a 2011, o número cresceu para 428 casos ao longo de 77 municípios (SÃO PAULO, 2012). A reemergência dos casos no estado de São Paulo foi associada ao crescente número de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), hospedeiro amplificador da bactéria, e sua expansão para áreas urbanas (LABRUNA, 2009).

O primeiro relato clínico da RMSF foi realizado no ano de 1899 em Idaho, EUA, por Edward E. Maxey, que a descreveu como: “*Uma doença febril, caracterizada clinicamente por um contínuo de febre alta e erupções purpúreas na pele, aparecendo primeiramente nos tornozelos, pulsos e testa, mas rapidamente se espalhando para todas as partes do corpo*” (DANTAS-TORRES, 2007; RAOULT; ROUX, 1997). Em geral, aproximadamente sete dias após a picada do carrapato infectado, sintomas como febre alta, mal-estar, calafrios, cefaleia e mialgia têm início. As petéquias ou máculas, que nomeiam a doença, aparecem em estágios mais avançados e, muitas vezes, nem ocorrem. Os sintomas inespecíficos da RMSF, que são comuns aos de viroses e outras infecções bacterianas, dificultam o

seu diagnóstico clínico (CHEN; SEXTON, 2008; RAOULT; ROUX, 1997). Os métodos laboratoriais para a identificação de *R. rickettsii*, por outro lado, são demorados e caros. O teste padrão-ouro recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) é o teste sorológico, no qual anticorpos IgG reagem com antígenos específicos de riquetsias em um teste de imunofluorescência indireta (RIFI) (FLICEK, 2007). No entanto, esses anticorpos não são detectáveis em menos de 7–10 dias de infecção, o que limita o diagnóstico da doença (DANTAS-TORRES, 2007). Avaliações histopatológicas e imunohistoquímicas também podem ser realizadas a partir de uma biópsia tecidual do paciente, já que *R. rickettsii* possui um tropismo por células endoteliais (BLANTON, 2013). A bactéria obtida por biópsia pode ser cultivada em meio de cultura de células (DANTAS-TORRES, 2007). Outros métodos incluem análise por microscopia eletrônica e análise molecular da biópsia (FLICEK, 2007).

Antes da descoberta da tetraciclina e cloranfenicol nos anos 1940's, não havia tratamento específico para a RMSF. Atualmente, o antibiótico de escolha para tratamento de adultos e crianças acometidos com RMSF é a doxiciclina enquanto o cloranfenicol é utilizado para o tratamento de mulheres grávidas (FLICEK, 2007). No entanto, apesar da infecção poder ser controlada com poucas doses de antibióticos orais, *R. rickettsii* ainda causa significativa morbidade e mortalidade, o que está diretamente relacionado ao diagnóstico tardio da infecção (CHEN; SEXTON, 2008; DANTAS-TORRES, 2007).

1.2 *Rickettsia rickettsii*, o agente etiológico

Em 1908, Howard Taylor Ricketts focou seus estudos na RMSF e detectou o agente etiológico da doença no sangue de pessoas doentes e em carrapatos. Ricketts, assim como von Prowazek, outro importante pesquisador na área das riquetsioses, morreu de tifo. Assim, os agentes da RMSF e do tifo foram nomeados, respectivamente, *Rickettsia rickettsii* e *R. prowazekii* em homenagem a eles (GROB; SCHÄFER, 2011; PAROLA et al., 2005).

R. rickettsii pertence à classe Alphaproteobacteria, ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae. Atualmente, os membros do gênero *Rickettsia* são classificados em quatro grupos: da febre maculosa, do tifo, em transição e ancestral (GILLESPIE et al., 2008). *R. rickettsii* pertence ao primeiro grupo, juntamente com

mais 19 espécies, dentre as quais é a mais patogênica (CHEN; SEXTON, 2008; PAROLA et al., 2009). *R. rickettsii* é um cocobacilo Gram-negativo pequeno (0,2–0,5 µm por 0,3–2,0 µm) e intracelular obrigatório, vivendo livre no citoplasma ou núcleo da célula hospedeira, ou seja, sem um vacúolo parasitóforo ao seu redor, como o encontrado em outras bactérias dessa ordem (DANTAS-TORRES, 2007). Em decorrência de seu hábito de vida parasitário e intracelular, as bactérias desse gênero apresentam uma redução no tamanho do seu genoma, o qual possui aproximadamente 1,2 Mb (BLANC et al., 2007).

No hospedeiro vertebrado, as riquetsias infectam as células do endotélio e paredes de vasos (FLICEK, 2007). No vetor invertebrado, infectam todas as células, apresentando, portanto, transmissão transestadial (perpetuação do agente em todos os estádios de vida) e transovariana (transmissão da bactéria para a prole) (BURGDORFER; BRINTON, 1975; MACALUSO et al., 2001). *R. rickettsii* também já foi detectada em espermatogônia, espermátocitos e espermátides maduras de carrapatos machos (HAYES et al., 1980). Porém a importância epidemiológica desse fato ainda não foi comprovada. *R. rickettsii* também infecta diversos tipos de células em cultura (Vero, L929, MRC5, células embrionárias de pulmão humano e células de carrapatos) (DANTAS-TORRES, 2007).

1.3 Carrapatos vetores

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas que se alimentam obrigatoriamente do sangue e/ou da linfa de animais vertebrados. Além do desconforto causado pela picada, os carrapatos ainda transmitem uma grande diversidade de patógenos ao hospedeiro durante o repasto sanguíneo (DANTAS-TORRES et al., 2012; SONENSHINE, 1991). De acordo com características morfológicas e fisiológicas, os carrapatos são classificados em duas principais famílias: Argasidae e Ixodidae. Os argasídeos, conhecidos como “carrapatos moles”, têm fases parasitárias curtas (de horas a poucos dias), apresentando estádios de ovo, larva, vários estádios de ninfa e estágio adulto. No estágio adulto, realizam várias cópulas e ovipõem uma pequena coleção de ovos após cada uma delas (KOPACEK et al., 2010). Já os ixodídeos, conhecidos como “carrapatos duros”, possuem tipicamente três estádios de desenvolvimento (larva, ninfa e adultos) e, em sua maioria, dependem da alimentação em três hospedeiros para completar seu

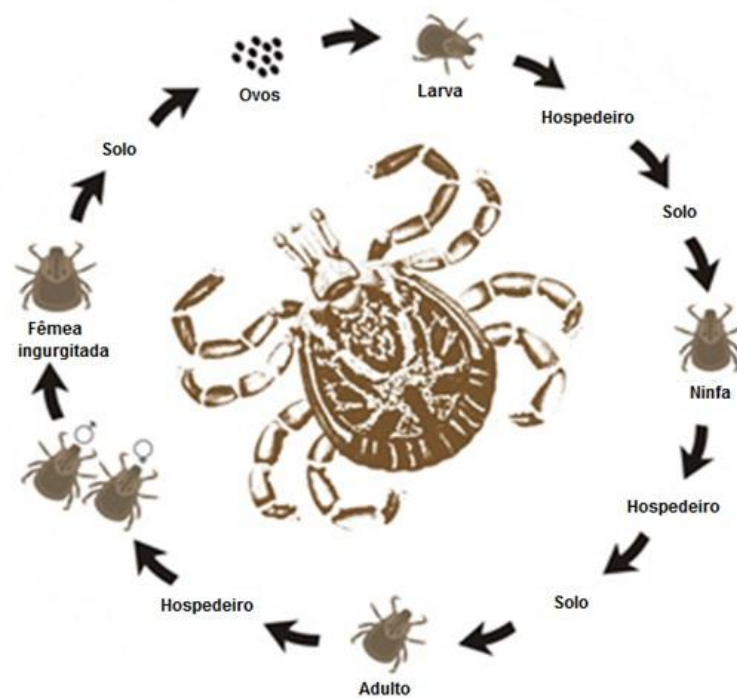
ciclo de vida (são, portanto, trioxenos). Diferentemente dos argasídeos, carrapatos ixodídeos alimentam-se por períodos mais longos, de até três semanas. Como consequência do longo período de alimentação, nesta família encontram-se diversos gêneros de carrapatos que transmitem doenças ao homem e a outros animais (DANTAS-TORRES et al., 2012).

R. rickettsii é transmitida ao homem e a outros vertebrados por diferentes espécies de carrapatos ixodídeos. Nos EUA, o carrapato comum do cão, *Dermacentor variabilis*, é o principal responsável pela transmissão na costa leste, enquanto *D. andersoni* transmite a doença a oeste (DANTAS-TORRES et al., 2012; FLICEK, 2007). No Brasil, os carrapatos responsáveis pela transmissão da bactéria são os pertencentes ao gênero *Amblyomma*: *A. cajennense* e *A. aureolatum*. *A. cajennense* é uma espécie de carrapato comum na América Central e do Sul e é encontrado naturalmente infectado com *R. rickettsii* em várias localidades (DANTAS-TORRES, 2007). Conhecido como um carrapato antropofílico e o que mais frequentemente infesta humanos no Brasil, é considerado o mais importante vetor da FMB (PAROLA et al., 2009). As capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e os gambás (*Didelphis spp.*) são incriminados como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para este carrapato (PAROLA; LABRUNA; RAOULT, 2009).

1.4 *Amblyomma aureolatum*

A. aureolatum é apontado como vetor de *R. rickettsii* na região metropolitana de São Paulo desde os anos 1930s (PAROLA; LABRUNA; RAOULT, 2009). Também chamado de “carrapato-amarelo-do-cão”, é encontrado em áreas de Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste, onde as condições de alta umidade e temperaturas amenas predominam durante o ano todo (PINTER et al., 2004). Assim como a maioria dos carrapatos ixodídeos, *A. aureolatum* é um carrapato trioxeno, ou seja, se alimenta em três hospedeiros durante seu ciclo vida, que dura cerca de quatro a cinco meses, descendo ao solo após cada repasto sanguíneo para realizar a ecdise (**Figura 1**) (RODRIGUES et al., 2002).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Amblyomma aureolatum*.



Nota: As larvas eclodem no solo e buscam seu primeiro hospedeiro. Após repasto sanguíneo, as larvas ingurgitadas caem ao solo onde ocorre a ecdise para o estágio de nífa. Ao encontrarem um novo hospedeiro, as ninfas realizam repasto sanguíneo e caem novamente ao solo onde ocorre a última muda para o estágio adulto. Os adultos (machos e fêmeas) sobem no hospedeiro e, após a cópula, a fêmea inicia um período de alimentação rápida. Após ingurgitamento completo, a fêmea cai ao solo para realizar a postura dos ovos.

Fonte: Modificado de EMBRAPA, 2010.

Durante os dois primeiros estádios, de larva e de nífa, esse carrapato alimenta-se do sangue de pequenos roedores e de pequenas aves que frequentam o solo, de modo a manter contato com o local onde supostamente estão as fases imaturas do carrapato (PINTER, 2004). Suspeita-se que o roedor *Euryzomatomys spinosus* seja o hospedeiro amplificador de *R. rickettsii*, já que é abundante na região e é hospedeiro de fases imaturas de *A. aureolatum* (PAROLA et al., 2009). Na fase adulta, o principal hospedeiro é o cão (*Canis familiares*), que também pode infestar acidentalmente humanos, aos quais pode transmitir FMB (SÃO PAULO, 2012). Em locais endêmicos como o município de Mogi das Cruzes (SP), cães de ambientes rurais próximos a áreas remanescentes de floresta tropical são expostos a carrapatos infectados com *R. rickettsii*, podendo adquirir a infecção e ainda representar um potencial risco para a transmissão humana ao carregarem os vetores para o ambiente domiciliar (FORTES; BIONDO; MOLENTO, 2011).

Apesar do papel significativo dos cães na epidemiologia da FMB devido à proximidade a seres humanos, apenas recentemente a doença clínica em cães foi descrita no Brasil, a partir da confirmação de FMB em dois animais procedentes do município de Itu, no estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2009). Esse fato destaca a gravidade da infecção e a dificuldade de diagnóstico na população canina. É importante ressaltar que, no referido município, a enfermidade já fora relatada anteriormente em seres humanos, reforçando a circulação do patógeno no local (LABRUNA et al., 2009).

Além de vetores, os carrapatos são importantes reservatórios de *R. rickettsii* na natureza (BURGDORFER, 1988; LABRUNA et al., 2011; SOARES et al., 2012). Os carrapatos desempenham esse papel devido à capacidade de transmitir a bactéria transovarianamente e transestadialmente. Dessa forma, o carrapato permanece infectado durante toda a vida, sendo capaz de disseminar o patógeno para vários hospedeiros, além de transmiti-lo para as gerações subsequentes (DANTAS-TORRES, 2007). Entretanto, a infecção pela bactéria possui um efeito deletério nos carrapatos, diminuindo sua sobrevivência e reprodução (BURGDORFER, 1988; NIEBYLSKIET al., 1999; SOCOLOVSCHI et al, 2012).

1.5 Glândula salivar: aquisição e transmissão

Uma vez tendo ingerido o sangue de um hospedeiro infectado, o carrapato adquire o patógeno, que inicia a colonização. A primeira barreira encontrada é o intestino do artrópode, onde ocorre a digestão. Já foi previamente descrito que se um patógeno é incapaz de estabelecer a infecção ao nível do epitélio do intestino médio, não há colonização das glândulas salivares e, conseqüentemente, não há transmissão, como previamente demonstrado para *Anaplasma marginale* (UETI et al., 2007). Também foi demonstrado que após 72 h do repasto sanguíneo, o intestino de *Dermacentor variabilis* está infectado com *R. montanensis* (CERAUL et al., 2007). As riquetsias que deixam as células do intestino invadem os hemócitos, garantindo o acesso a todos os tecidos e órgãos através da hemolinfa, como mostrado para *R. conorii* em *Rhipicephalus sanguineus* (SANTOS et al., 2002). Por fim, a bactéria chega às glândulas salivares onde, no caso de *R. rickettsii*, é capaz de se replicar (PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005). Pelo processo de salivação, o vetor é capaz de transmitir a bactéria a um novo hospedeiro durante o repasto

sanguíneo (SANTOS et al., 2002). As secreções da glândula salivar possuem papel fundamental na alimentação dos carrapatos, já que além de inibir respostas imunológicas do hospedeiro, auxiliam no balanço hídrico durante o repasto sanguíneo. Por essa relação direta com o hospedeiro, a saliva é um importante veículo de transmissão de patógenos para o vertebrado (VALENZUELA et al., 2004). Assim, compreender mecanismos de invasão da glândula salivar por patógenos e seus efeitos sobre o carrapato podem permitir o desenvolvimento de estratégias para a prevenção da transmissão desses patógenos. Como exemplo, vacinas que incapacitem um repasto sanguíneo podem ser capazes de evitar a transmissão de patógenos (HOVIUS et al., 2008).

1.6 Interações moleculares entre vetor e patógeno

O estudo da interação molecular entre carrapatos vetores e os patógenos por eles transmitidos podem contribuir para uma melhor compreensão acerca da virulência desses microrganismos e dos mecanismos que eles utilizam para invadir e colonizar os tecidos de seus vetores. Alguns estudos de caracterização dos efeitos da infecção de diferentes patógenos sobre o perfil de expressão gênica de carrapatos foram previamente realizados. Em *Ixodes scapularis*, o principal vetor europeu de *Borrelia burgdorferi*, foi demonstrado que a infecção por essa espiroqueta induz a expressão gênica de moléculas como tiorredoxinas peroxidases, glutathione S-transferase (GST), defensina e uma proteína com domínio de fator von Willebrand (RUDENKO et al., 2005). Já em carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infectados pelo protozoário *Babesia bovis*, unidades de citocromo c oxidase, glutamina sintetase e um inibidor de serina-proteases Kunitz-type foram induzidas (RACHINSKY et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que a infecção de *I. scapularis* por um flavivírus leva à expressão diferencial de diversos genes, incluindo peptídeos antimicrobianos como a microplusina e a defensina, inibidores de proteases das famílias Kunitz e serpina, proteínas secretadas, NADH desidrogenase, lipocalinas, dentre outras (MCNALLY et al., 2012).

Dentre os estudos de interação de carrapatos com membros da ordem Rickettsiales, destaca-se o estudo da expressão diferencial em glândulas salivares de *R.(B.) microplus* em resposta à infecção com *A. marginale* (ZIVKOVIC et al., 2010). Nesse estudo, mostrou-se que os genes codificadores de uma proteína

ligante de histamina, um fator von Willebrand, um precursor de inibidor Kunitz-*type*, uma subolesina e uma metalotioneína são induzidos pela infecção. Com os mesmos modelos, foi realizada uma análise temporal dos transcritos em dois tecidos do carrapato: glândulas salivares e intestino, tendo sido demonstrado que a glutationala S-transferase, uma serina proteinase de intestino, a NADH desidrogenase e o citocromo B561 apresentam expressão induzida pela infecção (MERCADO-CURIEL et al., 2011).

A relação molecular de bactérias do gênero *Rickettsia* e carrapatos também foi previamente estudada. A indução da expressão de moléculas associadas à infecção foram identificadas em *D. variabilis* infectado por *R. montanensis* através de display-PCR diferencial (MACALUSO et al., 2003). Em 2003, Mulenga e colaboradores analisaram, através de hibridação subtrativa por supressão (SSH), genes diferencialmente expressos em *D. variabilis* também infectados por *R. montanensis*. Dentre os genes identificados como diferencialmente expressos, 11 possuíam similaridades com sequências de peptídeos associados à resposta imune do carrapato, à adesão ou reconhecimento de moléculas e à resposta ao estresse. Um dos genes relacionados ao estresse codifica uma GST. Esse mesmo gene foi analisado por Dreher-Lesnick et al. (2006), que observaram uma indução pronunciada do gene da GST em carrapatos *D. variabilis* após a alimentação sanguínea. Como a infecção do carrapato por riquetsias é feita principalmente pela ingestão de sangue infectado de mamíferos, os autores sugeriram uma relação entre esse gene e a resposta contra a infecção. Nesses mesmos modelos, foi demonstrada a indução da expressão de genes antimicrobianos como defensina-1, defensina-2 e lisozima, sugerindo que os peptídeos antimicrobianos desempenham um papel importante na proteção contra a invasão do carrapato por riquetsias (CERAUL et al., 2007). Posteriormente, foi demonstrado que um inibidor Kunitz-*type* apresenta uma atividade bacteriostática contra a *R. montanensis* e, possivelmente, impede a invasão da célula hospedeira através de uma associação com a bactéria (CERAUL et al., 2008; CERAUL et al., 2011). Apesar desses estudos terem apontado importantes fatores envolvidos nas interações moleculares entre riquetsias e carrapatos, eles não podem ser extrapolados para a relação de *R. rickettsii* e seus vetores, uma vez que *R. montanensis* é avirulenta.

Em suma, fica evidente que a infecção de carrapatos por microrganismos modula a sua expressão gênica, sendo que alguns dos genes diferencialmente

expressos são importantes para o controle da infecção no vetor e/ou sua transmissão para o hospedeiro vertebrado. Desse modo, entender as relações moleculares entre patógenos e seus vetores pode gerar conhecimento para desenvolvimento de novas estratégias tanto para o controle de carrapatos infectados.

1.7 Bibliotecas subtrativas de cDNA

Métodos de hibridização subtrativa são ferramentas valiosas para a identificação de genes diferencialmente regulados (DIATCHENKO et al., 1996). Durante as últimas décadas, numerosas técnicas de hibridização subtrativas têm sido desenvolvidas e usadas para isolar genes significativos em diversos sistemas (BUZDIN; LUKYANOV, 2007). Hibridização subtrativa por supressão (SSH) é um método amplamente utilizado para a separação de moléculas de DNA que distinguem duas amostras de DNA estreitamente relacionadas de qualquer cDNA ou DNA genômico (DIATCHENKO et al., 1996; DIATCHENKO et al., 1999).

A metodologia de SSH normaliza a abundância da sequência na população de cDNA alvo, necessitando apenas de um passo de hibridização subtrativa, e pode alcançar um enriquecimento 1000 vezes maior por cDNA expresso diferencialmente. Além disso, o método é baseado em reações em cadeia da polimerase (PCR) e combina normalização e subtração em um único procedimento. No entanto, na prática, nem todos os genes expressos diferencialmente são igualmente enriquecidos por SSH (DIATCHENKO et al., 1996; DIATCHENKO et al., 1999). Apesar disso, essa ainda é uma técnica bastante utilizada para comparações de diferentes fenótipos (DIATCHENKO et al., 1996; Diatchenko et al., 1999).

1.8 RNA de interferência: estudo funcional de um gene e efeitos frente à infecção por patógenos em carrapatos

Uma vez determinados os genes modulados por uma infecção, a caracterização funcional dos mesmos é fundamental. A interferência por RNA é um processo de silenciamento gênico de uma sequência específica induzida por uma dupla fita de RNA (dsRNA), auxiliando na identificação rápida da função de um gene (MELLO; CONTE, 2004). Por sua alta eficiência, a técnica tem sido utilizada para a

caracterização funcional de produtos gênicos em carrapatos (ALJAMALI; SAUER; ESSENBERG, 2002). O silenciamento da expressão dos genes da glutathione S-transferase (GST), da ubiquitina, da V-ATPase, da selenoproteína M e da subolesina diminuiu efetivamente os níveis de infecção de carrapatos *D. variabilis* por *A. marginale* (DE LA FUENTE et al., 2007). O silenciamento gênico de algumas dessas proteínas parece também ter um efeito direto na sobrevivência dos carrapatos, diminuindo a capacidade de aderência à pele do hospedeiro e aumentando a mortalidade. Os autores sugerem que o conjunto destas proteínas seja considerado como alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas, visando o controle tanto dos carrapatos e a infecção por *A. marginale* em bovinos. Em um novo estudo, observou-se que o silenciamento de GST, vATPase, SelM e subolesina promove uma mudança no padrão das formas densas e reticuladas das colônias de *A. marginale*, o que pode afetar sua multiplicação (KOCAN et al., 2009). Intrigantemente, o silenciamento do peptídeo antimicrobiano varisina (uma defensina) provocou uma redução da infecção com *A. marginale* em *D. variabilis* (KOCAN et al., 2008). Adicionalmente, foi demonstrado que o silenciamento de um inibidor Kunitz-type nessa mesma espécie de carrapato aumenta em aproximadamente 90% a invasão por *R. montanensis* (CERAUL et al., 2008; CERAUL et al., 2011).

2 OBJETIVOS

Com base nos dados da literatura acima reportados, o presente estudo teve como objetivo geral estudar os efeitos da infecção por *Rickettsia rickettsii* sobre a expressão gênica de carrapatos *Amblyomma aureolatum* e caracterizar funcionalmente alguns dos genes induzidos. Os objetivos específicos foram:

1. Determinar os genes diferencialmente expressos nas glândulas salivares de fêmeas de *Amblyomma aureolatum* infectadas com *Rickettsia rickettsii* por hibridação subtrativa por supressão (SSH);
2. Validar os dados de modulação da expressão gênica por RT-qPCR;
3. Analisar os efeitos do silenciamento gênico de três genes na transmissão e aquisição de *R. rickettsii* e sobre o *fitness* dos carrapatos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Carrapatos e *Rickettsia rickettsii*

A linhagem de *Amblyomma aureolatum* utilizada no presente estudo é proveniente de Atibaia e foi mantida no laboratório do Prof. Dr. Marcelo B. Labruna (Departamento de Saúde Preventiva, FMVZ-USP).

Para realizar a infecção experimental dos carrapatos, foi utilizada a cepa Taiacu de *Rickettsia rickettsii*. Essa cepa foi isolada a partir da inoculação de um homogeneizado de um espécime de *A. aureolatum* infectado em cobaias (*Cavia porcellus*), as quais foram sacrificadas durante o pico febril da infecção (PINTER; LABRUNA, 2006). Os órgãos dessa cobaia foram dissecados, congelados a -80 °C e utilizados como inóculo em infecções subsequentes.

3.2 Infecção experimental de carrapatos

As larvas foram alimentadas em cobaias (*Cavia porcellus*) livres da infecção (grupo controle) ou infectadas intraperitonealmente com *R. rickettsii* (grupo infectado) utilizando o inóculo descrito no item 3.1. As larvas ingurgitadas de ambos os grupos foram transferidas para incubadoras BOD com temperatura ajustada para 25 °C e umidade relativa (UR) de 95% (PINTER et al., 2002; PINTER et al., 2004) para que realizassem a ecdise para a fase de ninfa. Após o término da ecdise, as ninfas foram alimentadas em cobaias livres de infecção e, após a alimentação, foram transferidas para uma incubadora BOD nas mesmas condições acima descritas. Após a ecdise, os adultos foram alimentados por três dias em cães (*Canis familiares*) não infectados.

Para restringir a área de fixação dos carrapatos, impedindo a fuga e permitindo um maior controle do processo parasitário, foram utilizadas câmaras de tecido de algodão fixadas ao dorso previamente tricotomizado dos animais para a alimentação de todos os estádios. Todos os animais utilizados nas infestações (grupos controle e infectado) foram monitorados sorologicamente por RIFI com antígeno de *R. rickettsii* previamente à alimentação dos carrapatos conforme descrito por (LABRUNA et al., 2007). Os animais que receberam o inóculo de *R. rickettsii* foram monitorados clinicamente (aferimento da temperatura) durante todo o

período de alimentação dos carrapatos, e sorologicamente (RIFI) 21 dias após a exposição ao inóculo. Os procedimentos para a experimentação com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.3 Dissecção dos carrapatos

Os carrapatos foram imersos em álcool 70% por 10 min para a desinfecção da cutícula, sendo em seguida lavados em tampão salino fosfato (PBS; NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 7,4) estéril. Os exemplares foram transferidos para uma base de parafina 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 (Leica, Alemanha) com o auxílio de uma lâmina de bisturi. A cutícula dorsal foi rebatida com o auxílio de uma pinça e as glândulas salivares e o intestino foram separados, lavados em PBS estéril e transferidos individualmente para tubos contendo 50 µL de *RNAlater* (Life Technologies, EUA). Todas as amostras foram armazenadas a -20 °C até a utilização para a extração de ácidos nucleicos.

3.4 Extração de DNA genômico e RNA total

As glândulas salivares e intestinos, armazenados em *RNAlater* (Life Technologies), foram homogeneizados no mesmo reagente com o auxílio de um homogeneizador Potter-Elvehjen. Os homogeneizados foram, então, submetidos individualmente à extração simultânea de DNA genômico (DNAg) e de RNA total com o *InviTrap® Spin Cell RNA Mini Kit* (STRATEC Molecular GmbH, Alemanha), conforme protocolo descrito pelo fabricante.

3.5 Determinação do número de riquetsias nos tecidos dos carrapatos

O número de bactérias por par de glândulas salivares ou intestino foi determinado através de reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) com sonda TaqMan para o gene de cópia única *gltA* (codificador da enzima citrato

sintase) de *R. rickettsii*, conforme previamente estabelecido por (Labruna et al., 2004). O DNAg extraído dos carrapatos ou diluições seriadas de DNA plasmidial contendo o fragmento do gene *gltA* ($5,3 \times 10^7$ a $5,3 \times 10^2$ cópias) foram utilizados como molde nas reações. Para cada reação, foram utilizados 2 μ L de material genético, 10 μ L de *Quantimix Easy Probes kit* (Biotools, Espanha), 8 pmols do oligonucleotídeo CS-5 (5'-GAG AGA AAA TTA TAT CCA AAT GTT GAT-3'), 8 pmols do oligonucleotídeo CS-6 (5'- AGG GTC TTC GTG CAT TTC TT-3') e 0,5 pmol da sonda interna fluorogênica (5' - 56 FAM - CAT TGT GCC ATC CAG CCT ACG GT - BHQ 1 - 3'), sendo o volume de 20 μ L completado com água ultrapura. Em um termociclador *Mastercycler® ep realplex2* (Eppendorf, Alemanha), realizou-se um programa com 2 minutos (min) iniciais a 95 °C seguidos de 50 ciclos de 15 segundos (s) a 95 °C, 15s a 55 °C e 20 s a 72 °C.

3.6 Construção das bibliotecas subtrativas de cDNA

O RNA total das glândulas salivares de 12 fêmeas adultas de *A. aureolatum*, apresentando entre $6,00 \times 10^7$ e $3,00 \times 10^8$ riquétsias, foi reunido para a obtenção de uma amostra *pool* infectada, denominada AaI. O RNA de 12 fêmeas adultas não-infectadas foi utilizado para a obtenção de uma amostra *pool* controle, nomeada AaC.

3.6.1 Síntese de cDNA e digestão com endonuclease *Rsa I*

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos *SMART II A* (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGCrGrGrG-3') e *CDS* (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA-d(T)30-3') e 0,5 μ g de RNA total como molde. Um μ L da amostra de cDNA diluída 5x em H₂O ultrapura (v/v) foi utilizada como molde para a PCR de amplificação com o oligonucleotídeo *SMART II PCR* (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'). As amostras resultantes foram submetidas à digestão com *RsaI*.

3.6.2 Hibridação subtrativa por supressão (SSH) e construção das bibliotecas AaC e Aal

A hibridação subtrativa por supressão foi realizada nas duas direções (Aal *versus* AaC e AaC *versus* Aal), utilizando-se o método descrito por (DIATCHENKO et al., 1996; DIATCHENKO et al., 1999). Para cada direção, duas populações *tester* foram construídas pela ligação de dois diferentes adaptadores de supressão (Adaptadores 1 e 2R, **Tabela 1**).

Tabela 1 - Adaptadores de supressão utilizados na construção das populações *tester* das bibliotecas subtrativas de cDNA.

Adaptador 1	5' -CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCGCCGGGCAGGT-3' 3' -GGCCCGTCCA-5'
Adaptador 2R	5' -CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTGCGCGCCGAGGT-3' 3' -GCCGGCTCCA-5'

Cada população *tester* foi misturada com um excesso da população *driver* (quantidade 30 vezes maior que a da população *tester*), que não apresenta adaptadores. Subsequentemente, a mistura foi submetida a uma desnaturação seguida de renaturação. Após essa primeira hibridação, as duas populações *tester* foram misturadas e repetiu-se o procedimento de hibridação. O cDNA subtraído foi submetido a uma PCR primária com o oligonucleotídeo *PCR Primer 1* (5'- CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C -3'). As amostras resultantes foram submetidas a uma *Nested PCR* com os oligonucleotídeos *Nested Primer 1* (5'- TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T -3') e *Nested Primer 2R* (5'- AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT -3'). As amostras resultantes da *Nested PCR* foram utilizadas para a construção das bibliotecas AaC (*A. aureolatum* – grupo controle) e Aal (*A. aureolatum* – grupo infectado). Para tal, após a purificação do cDNA das amostras obtidas pela *Nested PCR*, 40 ng foram utilizados para a clonagem no vetor pAL16/17. O produto resultante do procedimento de ligação foi utilizado para a transformação de *Escherichia coli*.

3.6.3 Análise das bibliotecas de cDNA para a identificação de clones específicos de cada biblioteca

Noventa e seis clones de coloração branca da biblioteca AaC e 480 clones da biblioteca Aal foram selecionados aleatoriamente, transferidos para poços de placas de 96 poços e utilizados para a varredura diferencial. Cada clone foi cultivado em 140 μ L de meio Lúria-Bertani (LB) contendo ampicilina (concentração final de 75 μ g/mL) por 10 h a 37°C. Alíquotas de 1 μ L foram submetidas a uma PCR com os oligonucleotídeos *T7* (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') e *SP6* (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA-3'). Dois μ L do produto da PCR foram aplicados em membranas de *nylon* e hibridados com sondas Aal e AaC- específicas marcadas radioativamente com P-32. Ao restante da cultura bacteriana, adicionou-se glicerol (concentração final de 20%) e as placas foram armazenadas a -70°C.

As sondas Aal e AaC- específicas foram produzidas submetendo-se as amostras resultantes da PCR primária, descrita no item 3.6.2, a uma *Nested* PCR com os oligonucleotídeos *Nested Primer 1 S* (5'-GCC GCC CGG GCA GGT-3') e *Nested Primer 2R S* (5'-GGT CGC GGC CGA GGT-3'). Os produtos desta *Nested* PCR foram purificados e utilizados para a marcação com P-32.

3.6.4 Sequenciamento e anotação

Preparações de plasmídeos dos clones específicos de cada biblioteca foram obtidas e as duas fitas complementares foram sequenciadas utilizando-se os oligonucleotídeos *pAL16/17 dir* (5'-CCA GGG TTT TCC CAG TCA CGA-3') ou *pAL 16/17 rev* (5'-CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCA-3') e o ABI PRISM® BigDye™ Primer v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Life Technologies). O sequenciamento foi realizado em um equipamento ABI 3100 (Life Technologies) na Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão (FUNEP) da UNESP (Jaboticabal-SP).

Os cromatogramas obtidos pelo sequenciamento foram submetidos ao *pipeline* de processamento e pré-anotação no sistema EGene (DURHAM et al., 2005) em colaboração com o Prof. Dr. Arthur Gruber (ICB-USP). Este pipeline consistiu na avaliação da qualidade, no mascaramento dos oligonucleotídeos e do vetor, na filtração de leituras de baixa qualidade, no aparamento de sequências de baixa qualidade nas extremidades de leitura, na filtração de tamanho e na filtração de potenciais contaminantes [sequências ribossômicas, bacterianas, de cobaias, de

coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), de cães e humanas (*Homo sapiens*)]. Em seguida, as sequências processadas e aceitas pelo *pipeline* foram montadas pela utilização do programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999) com parâmetros *default*. As sequências montadas foram, então, submetidas a um *pipeline* de anotação automática no sistema EGene2 [desenvolvido pelos Profs. Drs. Alan M. Durham (IME-USP) e Arthur Gruber]. Este *pipeline* consistiu na busca de fases abertas de leitura (ORFs), na tradução conceitual, na busca de repetições seriadas com o Tandem repeats finder (BENSON, 1999), na busca de similaridade por BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), na busca de domínios conservados por RPS-BLAST (Marchler-Bauer et al., 2002) contra a base de dados CDD (MARCHLER-BAUER et al., 2007), na busca de motivos proteicos com o InterProScan (ZDOBNOV; APWEILER, 2001; QUEVILLON et al., 2005), na busca de domínios transmembranares com os programas TMHMM (KROGH et al., 2001) e Phobius (KALL et al., 2004) e na busca de peptídeo sinal com os programas SignalP (BENDTSEN et al., 2004) e Phobius. Além disso, a partir dos resultados de Interpro, foi realizado o mapeamento e quantificação de termos GO nas três ontologias (função molecular, processo metabólico e componente celular), utilizando-se um subconjunto de ontologias (GO Slim). A partir da coleta de evidências de anotação descrita acima, o sistema EGene2 foi ainda utilizado para gerar arquivos de anotação nos formatos GFF3 e *Feature Table*, além de uma página *web* com os resultados indexados (a ser disponibilizada após a publicação dos dados).

3.7 Reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa (RT-qPCR)

Treze genes identificados como diferencialmente expressos por SSH foram selecionados para a validação por RT-qPCR. Os oligonucleotídeos específicos para cada um deles foram desenhados utilizando-se os programas Primer 3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000), analisados pelo Gene Runner vs 3.05 e sintetizados pela Life Technologies.

3.7.1 Transcrição reversa (RT)

Para a remoção de DNAg residual, 1 µg do RNA total de carrapatos infectados ou não por *R. rickettsii* foi tratado com a enzima *RQ1 RNase-free DNase* (Promega, EUA), conforme instruções do fabricante. Ao final do processo, o RNA foi utilizado como molde para a síntese de cDNA. Para tal, 10 pmols do oligo dT *Anchor* (5'-GACTCGAGTCGACATCGA (T)₁₇-3') foram incubados com o RNA por 10 min a 70 °C. Após resfriamento em banho de gelo por 1 min, 2,5 µL do tampão para a enzima Superscript III (Life Technologies) concentrado 10x, 2,5 µL de DTT (concentração final de 10 mM), 1 µL de uma mistura de dNTPs (concentração final de 0,4 mM), 2,5 µL de MgCl₂ (concentração final de 2,5 mM) e 1 µL de Superscript III (200U) foram adicionados à mistura. A reação foi incubada a 50 °C por 90 min. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C até sua utilização.

3.7.2 Reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR)

Uma mistura contendo 8 µL de *SYBR Green MasterMix* (Life Technologies), 1 µL de cada oligonucleotídeo específico (concentração final 0,2 pmol/µL) e 4 µL de água DEPC foram adicionados a 2 µL das amostras de cDNA (aproximadamente 100 ng). As PCR foram realizadas em um termociclador para PCR quantitativa, modelo Mastercycler® ep *realplex²* (Eppendorf) com o programa térmico de 2 min a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C e 20 s a 72 °C cada. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A quantidade de cDNA das amostras foi normalizada de acordo com a expressão do gene codificador da proteína ribossômica S3A. A relação entre a expressão do gene de interesse nos carrapatos infectados em relação à expressão do mesmo gene nos carrapatos controle foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste T de Student.

3.8 Determinação do número de mitocôndrias nas glândulas salivares de carrapatos

Cinquenta ng do DNAg extraído das glândulas salivares de carrapatos *A. aureolatum* infectados e não infectados com *R. rickettsii* foram utilizados como molde para a amplificação do gene mitocondrial codificador da subunidade 1 da citocromo c oxidase (COX1) (oligonucleotídeo senso: 5'- AGGTGCTCCAGACATTGCTT-3' e

antissenso: 5'-GTT CCT GCT CCT GAT TCG AT-3') ou do gene nuclear codificador da proteína ribossômica S3A (oligonucleotídeo senso: 5'- GTG CAG TGG CTA ATC CCA AC-3' e antissenso: 5'- CGA ATT GTT GAG GCC CAC TT-3') por qPCR. As reações foram realizadas em um termociclador *StepOne Plus* (Life Technologies), com as mesmas condições e o programa térmico descritos no item 3.7.2. O número de cópias de cada gene em cada amostra foi determinado com base em curvas-padrão construídas com diluições seriadas (10^2 a 10^8 moléculas) dos respectivos *amplicons*. Como ambos os genes estão representados por uma única cópia no genoma do carrapato, o número de mitocôndrias por célula foi calculado indiretamente pela razão entre o número de cópias do gene mitocondrial e o número de cópias do gene nuclear. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste T de Student.

3.9 Sequenciamento do cDNA de genes selecionados para o silenciamento

A porção 3' UTR da sequência de nucleotídeos do cDNA da hebraeína (Aa_20) e da proteína dissulfeto isomerase (Aa_26) foram obtidas pelo método de Sanger. Inicialmente, o RNA de carrapatos *A. aureolatum* foi utilizado como molde para a transcrição reversa em cDNA utilizando-se o mesmo procedimento descrito no item 3.7.1. Em seguida, 150 ng de cDNA e 10 μ L de QuantiMix Easy Probes kit (Biotools) foram adicionados a 1 nmol do oligonucleotídeo senso correspondente à sequência a ser analisada e 1 nmol do *Adaptor* (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'), completando-se o volume de 20 μ L com água ultrapura. O programa térmico utilizado foi de 94 °C por 10 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, com 10 min a 72 °C em um termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf).

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (massa/volume), utilizando-se uma voltagem constante de 100 V. Para a visualização das bandas, o gel foi incubado em uma solução de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) em tampão TBE (Tris-borato EDTA) por 20 min. Depois da lavagem do gel com água destilada para a retirada do excesso do brometo de etídio, o mesmo foi analisado em um transiluminador acoplado a um sistema de vídeo Eagle Eye™ II (Stratagene, EUA). As bandas correspondentes aos *amplicons* foram recortadas e o

DNA foi purificado com o *Wizard[®] SV gel and PCR clean-up system* (Promega), conforme procedimentos descritos pelo fabricante. Em seguida, procedeu-se a ligação como plasmídeo, utilizando-se o *pGEM[®]-T Easy Vector System* (Promega) seguindo-se as orientações do fabricante. Vinte μL do produto de ligação foram adicionados a 100 μL de uma suspensão de bactérias *Escherichia coli* DH5- α . Após incubação em gelo por 30 min, a cultura foi submetida a um choque térmico de 1,5 min a 42 °C seguidos de 3 min em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 100 μL de meio Lúria-Bertani (LB; triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) à cultura, a qual foi submetida a uma incubação a 37 °C por 1 h. Findo esse tempo, a suspensão bacteriana foi semeada em meio LB-ágar a 2% (m/v). Três unidades formadoras de colônia (UFC) de coloração branca foram transferidas para 3 mL de meio LB e após 16 h de agitação a 37 °C, os plasmídeos foram extraídos e purificados da suspensão com o auxílio do *Wizard[®] Plus Miniprep DNA Purification System* (Promega). Para o sequenciamento dos fragmentos, utilizou-se o *kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Life Technologies), segundo as orientações do fabricante, em sistema de sequenciamento automático ABI 3100 (Life Technologies).

Por fim, as sequências obtidas foram analisadas pelos programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.1.3.0), *Clustal W* (versão 2.0.3) e *SignalP 4.0 Server*.

3.10 Silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi)

3.10.1 Síntese de RNA dupla fita (dsRNA)

Oligonucleotídeos específicos para a sequência codificadora da hebraeína (Aa_20; Heb), da proteína dissulfeto isomerase (Aa_26; PDI) e da proteína com domínio Kunitz-type (Aa_25; Kun25) foram desenhados e sintetizados pela Life Technologies acoplados a uma cauda T7. Como gene controle (gene não-relacionado), foi utilizada a dsRNA para a proteína de superfície de membrana (MSP1) de *Plasmodium falciparum*, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Gerhard Wunderlich (Depto. de Parasitologia, ICB-USP).

Os oligonucleotídeos foram utilizados para a síntese de duplas fitas de RNA (dsRNA) por PCR, utilizando-se o *T7 Ribomax Express RNAi System* (Promega), de

acordo com as recomendações do fabricante. Cada dsRNA foi desenhada para ter aproximadamente 400 pb. As dsRNA obtidas foram quantificadas através de um espectrofotômetro (NanoDrop-1000, Thermo Scientific, EUA), a fim de determinar o número de moléculas, e armazenadas a -80 °C até sua utilização nos experimentos.

3.10.2 Microinjeção de dsRNA

As dsRNA diluídas em PBS estéril foram administradas às ninfas e aos adultos de *A. aureolatum* com o auxílio de agulhas de vidro acopladas a um injetor Nanoject II (Drummond Scientific, EUA). A microinjeção foi realizada na articulação entre a coxa e o trocanter do terceiro apêndice das ninfas ou dos carrapatos adultos sob lupa esteroscópica (Leica, Alemanha). Ninfas foram microinjetadas com aproximadamente 10^{11} moléculas de dsRNA solubilizadas em 33 nL ou 69 nL de PBS. Os ácidos nucleicos de um homogeneizado total das ninfas em 30 µL de RNA*later* foram obtidos conforme descrito no item 3.4.

Os carrapatos adultos foram injetados com aproximadamente 10^{14} moléculas de dsRNA em 69 nL de PBS. Após 24 h em BOD a 25 °C e umidade relativa de 95%, os carrapatos adultos foram alimentados em cães ou em coelhos. Alternativamente, as glândulas salivares e intestinos foram dissecados conforme descrito no item 3.3, e utilizados para a obtenção de ácidos nucleicos (item 3.4).

3.10.3 Avaliação do nível de silenciamento gênico

O RNA total extraído de todos os tecidos das ninfas ou das glândulas salivares ou dos intestinos dos adultos foi tratado com RQ1 RNase-free DNase (Promega) e utilizado como molde para a síntese de cDNA, conforme descrito no item 3.7.1. O silenciamento foi avaliado por PCR quantitativa. Para cada reação, foram utilizados 8 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (µ), 1 µL de cada oligonucleotídeo específico (concentração final 0,2 pmol/µL), 4 µL de água DEPC e 2 µL das amostras de cDNA (50 ng). Em um termociclador *StepOne Plus* (Life Technologies), realizou-se um programa com 10 min iniciais a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 60 s a 60 °C. Como normalizador foi utilizado o gene da proteína ribossômica S3A. A porcentagem de silenciamento de um dado gene

alvo no grupo microinjetado com sua respectiva dsRNA foi determinada considerando-se a sua expressão no grupo controle como 100%.

3.10.4 Avaliação da aquisição de *R. rickettsii* pelos carrapatos e da transmissão para o hospedeiro vertebrado

Para avaliar a aquisição de *R. rickettsii* pelos carrapatos, o DNAg extraído dos intestinos e das glândulas salivares foi utilizado como molde em qPCR, conforme descrito no item 3.5.

Para avaliar a transmissão de *R. rickettsii* para o hospedeiro (coelhos), os animais foram monitorados clinicamente pela aferição diária da temperatura após o início da alimentação dos carrapatos. Paralelamente, foram realizadas biópsias de pele antes do início da alimentação dos carrapatos e após 3 e 5 dias do início de febre dos animais. As biópsias foram realizadas utilizando-se *punchs* de 3 mm após anestesia local com 1 mL de lidocaína. Os tecidos foram armazenados em RNA later a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a extração de DNAg conforme descrito no item 3.4, o mesmo foi utilizado como molde em qPCR seguindo-se o procedimento detalhado no item 3.5. O soro dos animais também foi avaliado sorologicamente (RIFI) 21 dias após o início da alimentação dos carrapatos.

3.10.5 Avaliação do fitness

Algumas fêmeas adultas micrinjetadas com as dsRNA permaneceram alimentando-se até o ingurgitamento total. A mortalidade foi averiguada diariamente pela abertura das câmaras de alimentação. Finda a alimentação, o peso das fêmeas ingurgitadas sobreviventes e o peso da massa de ovos foram determinados. A taxa de fertilidade foi determinada pela razão entre o peso da massa de ovos e o peso da fêmea que realizou a postura.

4 RESULTADOS

4.1 Bibliotecas subtrativas de cDNA

Primeiramente, o número de riquetsias nas glândulas salivares e nos intestinos das fêmeas adultas do grupo de carrapatos infectados foi determinado por qPCR. Através da mesma metodologia, confirmamos que as fêmeas do grupo controle não estavam infectadas. Em seguida, uma amostra *pool* de RNA das glândulas salivares de 12 fêmeas do grupo infectado (Aal) e uma amostra *pool* de RNA das glândulas salivares de 12 fêmeas do grupo controle (AaC) foram encaminhadas a uma *facility* na Rússia (Evrogen). Após o procedimento de hibridação subtrativa por supressão (SSH), duas bibliotecas subtrativas foram construídas. Uma varredura diferencial de 96 clones da biblioteca AaC e de 480 clones da biblioteca Aal foi realizada com sondas AaC e Aal específicas marcadas com P-32. Vinte e dois clones da biblioteca AaC e 94 clones da biblioteca Aal foram considerados como diferencialmente expressos (dados não apresentados). Preparações de plasmídeos desses clones foram submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos. Do total de 274 cromatogramas submetidos ao processamento por bioinformática, foram aceitas 189 leituras, tendo sido descartadas 27 sequências por baixa qualidade, 19 por serem bacterianas e 10 por serem ribossômicas. As sequências montadas resultaram em um total de 43 contigs e 25 singlets, formando um conjunto de 68 sequências únicas. Destas, 56 representam genes de *A. aureolatum* com expressão induzida pela infecção com *R. rickettsii* (**Tabela 2**) e 12 representam genes reprimidos pela infecção (**Tabela 3**). A busca de similaridade por BLAST (utilizando-se um *E-value cutoff* de E-05) e a busca de domínios conservados revelou que 21 sequências não apresentam *hits* com outras sequências em bancos públicos de dados.

Tabela 2 - Similaridade entre as sequências representando genes induzidos de *A. aureolatum* com expressão gênica induzida nas glândulas salivares pela infecção por *R. rickettsii* e sequências disponíveis em bancos públicos de dados.

Contig ou Singlet	Anotação	Similaridade (Organismo)	E-value	Número de acesso no GenBank
Aa_01	<i>no hits</i>			
Aa_02	proteína grande de tegumento UL36		7,00E-07	
Aa_04	<i>no hits</i>			
Aa_05	fator de <i>splicing</i>	<i>Ixodes scapularis</i>	1,00E-28	XM_002414923.1
Aa_06	proteína hipotética	<i>Amblyomma maculatum</i>	6,00E-62	AEO35708.1
Aa_07	subunidade RPN7/PSMD6 do complexo regulatório do proteassoma 26S	<i>Ixodes scapularis</i>	3,00E-17	XM_002399599.1
Aa_08	subunidade I da citocromo oxidase C (COX1)	<i>Dermacentor reticulatus</i>	5,00E-169	AF132829.1
Aa_09	No hits			
Aa_10	RNA helicase SrmB ATP-dependente		4,00E-07	
Aa_11	subunidade I da citocromo oxidase C (COX1)	<i>Amblyomma americanum</i>	3,00E-165	DQ168131.1
Aa_13	proteína hipotética	<i>Amblyomma maculatum</i>	8,00E-43	AEO36850.1
Aa_15	citocromo b (citb)	<i>Amblyomma americanum</i>	0.0	DQ168129.1
Aa_16	monolaris com domínio Kunitz-type	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	2,00E-06	JAA60829.1
Aa_17	<i>no hits</i>			
Aa_18	<i>no hits</i>			
Aa_19	peptídio precursor secretado	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	2,00E-14	JAA60797.1
Aa_20	hebraeína	<i>Amblyomma hebraeum</i>	4,00E-26	AY437139.1
Aa_22	proteína secretada da glândula salivar 230	<i>Amblyomma variegatum</i>	7,00E-169	BK007197.1
Aa_23	glutamato desidrogenase 2 (glud2)	<i>Anolis carolinensis</i>	1,00E-22	XM_003227785.1
Aa_25	monolaris com domínio Kunitz-type	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	3,00E-04	JAA60829.1
Aa_26	proteína disulfeto isomerase (PDI)	<i>Amblyomma variegatum</i>	0.0	DQ377176.1
Aa_27	subunidade I da citocromo oxidase C (COX1)	<i>Amblyomma americanum</i>	0.0	DQ168131.1
Aa_28	fator de transcrição	<i>Amblyomma variegatum</i>	1,00E-143	BK007839.1
Aa_29	NADH desidrogenase	<i>Haemaphysalis humerosa</i>	4,00E-18	AY059256.1
Aa_30	proteína com partícula de reconhecimento de sinal de 72kDa variante 2	<i>Bombus impatiens</i>	2,00E-17	XM_003487358.1
Aa_32	sequência de microssatélite, clone DV_037	<i>Dermacentor variabilis</i>	3,00E-44	EF545253.1
Aa_33	monolaris com domínio Kunitz-type	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	3,00E-06	JAA60829.1

Aa_34	aldeído desidrogenase	<i>Ixodes scapularis</i>	5,00E-35	XM_002408397.1
Aa_36	subunidade III da citocromo oxidase C (COX3)	<i>Amblyomma americanum</i>	0.0	DQ168133.1
Aa_39	proteína hipotética secretada 193	<i>Amblyomma variegatum</i>	9,00E-05	BK007177.1
Aa_40	no hits			
Aa_41	no hits			
Aa_42	proteína hipotética	<i>Amblyomma maculatum</i>	3,00E-27	AEO36474.1
Aa_43	no hits			
Aa_44	proteína hipotética secretada rica em glicina 14	<i>Amblyomma variegatum</i>	1,00E-09	BK007487.1
Aa_45	subunidade III da citocromo oxidase C (COX3)	<i>Amblyomma americanum</i>	6,00E-117	DQ168133.1
Aa_46	RNA helicase SrmB ATP-dependente		1,00E-08	
Aa_47	subunidade I da citocromo oxidase C (COX1)	<i>Hialomma lusitanicum</i>	0.0	EU827720.1
Aa_48	no hits			
Aa_50	fator de alongação selenocisteíno-específico	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	4,00E-04	JAA58017.1
Aa_51	no hits			
Aa_52	no hits			
Aa_53	proteína hipotética	<i>Amblyomma maculatum</i>	7,00E-36	AEO35518.1
Aa_54	RNA helicase SrmB ATP-dependente		3,00E-09	
Aa_56	cisteína proteinase A (CysA) - catepsina L-like	<i>Rhipicephalus haemaphysaloides</i>	9,00E-20	AY336797.1
Aa_57	fator de alongação EF-1 alfa	<i>Ixodes scapularis</i>	0.0	XM_002411102.1
Aa_58	subunidade II da citocromo oxidase C (COX2)	<i>Amblyomma triguttatum</i>	6,00E-46	YP_044780.1
Aa_59	no hits			
Aa_60	no hits			
Aa_62	subunidade III da citocromo oxidase C (COX3)	<i>Amblyomma americanum</i>	3,00E-16	ABA19094.1
Aa_63	no hits			
Aa_64	no hits			
Aa_65	no hits			
Aa_66	short evasina	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	0.035	ACX53932.1
Aa_67	adenilato quinase	<i>Ixodes scapularis</i>	2,00E-104	XM_002403741.1
Aa_68	no hits			
Aa_69	no hits			

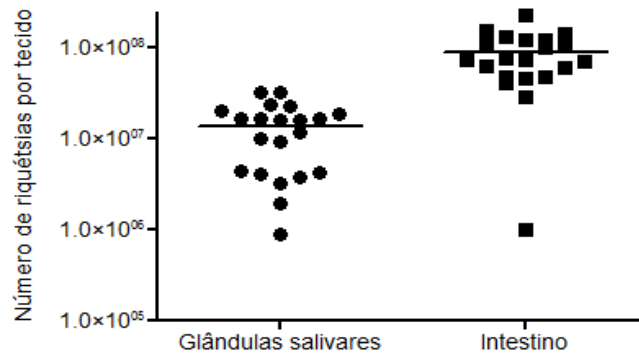
Tabela 3 - Similaridade entre as sequências representando genes reprimidos de *A. aureolatum* com expressão gênica reprimida nas glândulas salivares pela infecção por *R. rickettsii* e sequências disponíveis em bancos públicos de dados.

Contig ou Singlet	Anotação	Similaridade (Organismo)	E-value	Número de acesso no GenBank
Aa_03	hipotética proteína secretada do cimento rica em glicina	<i>Amblyomma variegatum</i>	2,00E-14	BK007705.1
Aa_12	proteína hipotética secretada rica em glicina 110	<i>Amblyomma variegatum</i>	4,00E-25	BK007112.1
Aa_14	proteína hipotética	<i>Amblyomma maculatum</i>	1,00E-34	AEO33329.1
Aa_21	proteína hipotética secretada rica em glicina 111	<i>Amblyomma variegatum</i>	6,00E-12	BK007628.1
Aa_24	proteína ligante de serotonina e histamina	<i>Dermacentor reticulatus</i>	2,00E-31	AF217101.1
Aa_31	<i>no hits</i>			
Aa_35	<i>no hits</i>			
Aa_37	<i>no hits</i>			
Aa_38	proteína hipotética	<i>Amblyomma maculatum</i>	6,00E-21	AEO35620.1
Aa_49	<i>no hits</i>			
Aa_55	chaperonina	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	3,00E-103	JAA60063.1
Aa_61	subunidade I da citocromo oxidase C (COX1)	<i>Aponomma fimbriatum</i>	1,00E-71	YP_006234431.1

4.2 Validação do dados de SSH por RT-qPCR

Para a validação dos dados obtidos por SSH, uma nova infestação foi realizada e o número de riquetsias nas glândulas salivares e nos intestinos de fêmeas foi determinado por qPCR (**Figura 2**). No geral, observou-se um maior nível de infecção nos intestinos (máximo de 10^8 bactérias) do que nas glândulas salivares (máximo de 10^7 bactérias). A maior parte dos carrapatos analisados apresentou nível de infecção nas glândulas salivares na ordem de 10^7 bactérias. O RNA extraído dessas fêmeas foi utilizado para as análises de qPCR, uma vez que as bibliotecas subtrativas haviam sido construídas com o RNA das glândulas salivares de fêmeas apresentando esse mesmo nível de infecção.

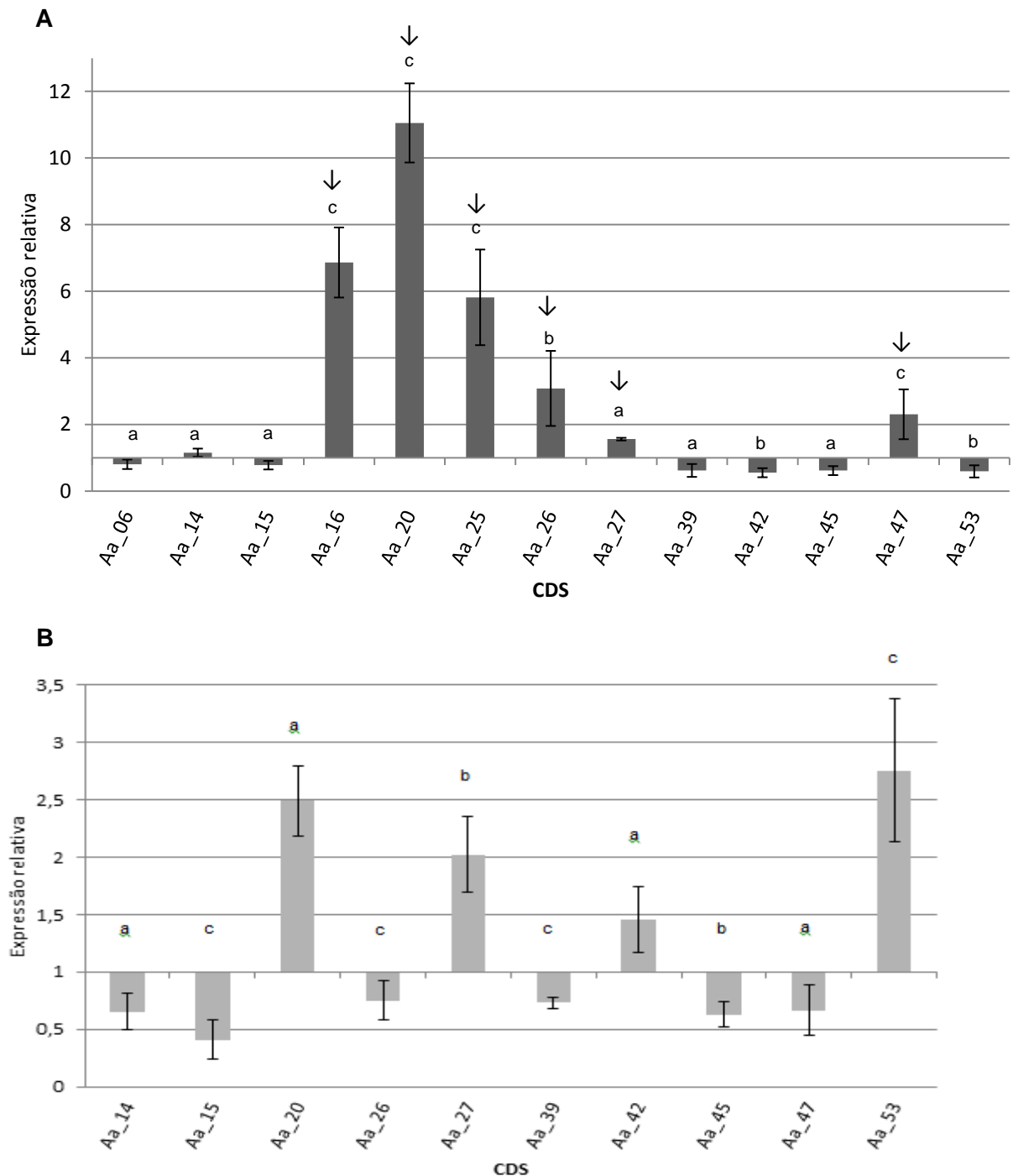
Figura 2 - Número de riquétsias nas glândulas salivares e intestinos de fêmeas adultas.



Nota: O número de riquétsias nos tecidos dos carrapatos foi determinado por qPCR com sonda TaqMan para o gene *gltA* (codificador da citrato síntese) de *R. rickettsii*.

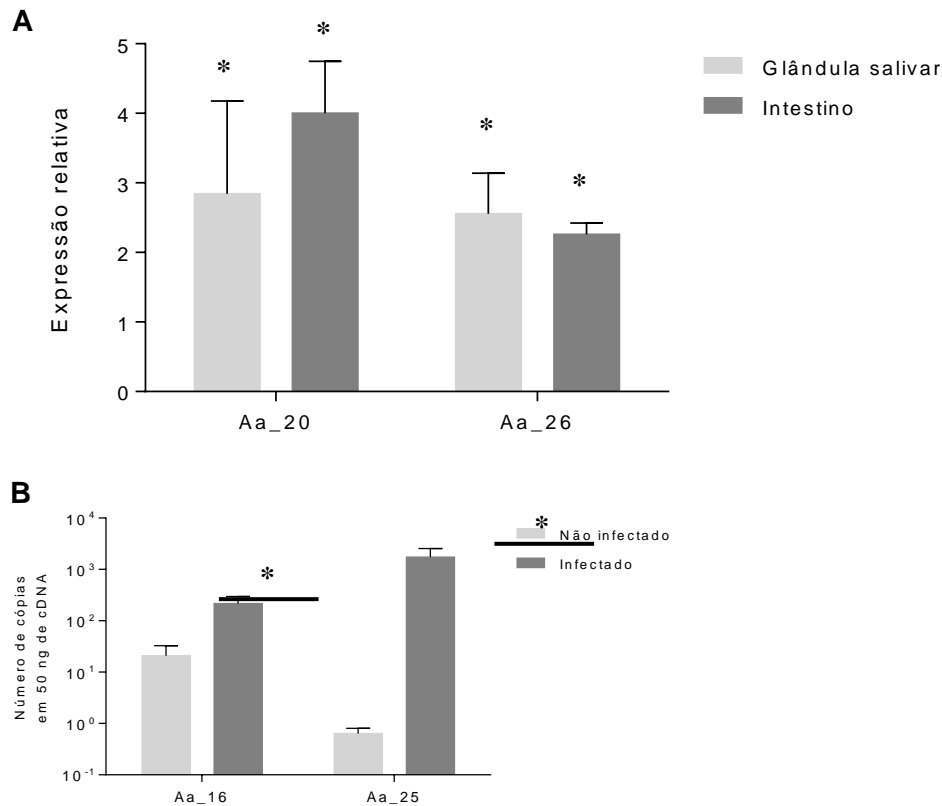
O nível de expressão de 13 genes identificados como diferencialmente expressos nas glândulas salivares de fêmeas de *A. aureolatum* infectadas por *R. rickettsii* por SSH foi avaliado por RT-qPCR (19,1% do total das sequências das bibliotecas). Dentre esses genes, seis [46,15%; codificadores de proteínas com domínio Kunitz-*type* (Aa_16 e Aa_25), hebraeína (Aa_20), PDI (Aa_26) e COX1 (Aa_27 e Aa_47)] tiveram o mesmo perfil transcricional previamente obtido por SSH (**Figura 3A**). O perfil transcricional dos 13 genes no intestino das fêmeas também foi determinado por RT-qPCR (**Figura 3B**). O gene codificador do citocromo b (Aa_15), da hebraeína (Aa_20), da COX1 (Aa_27), da proteína hipotética secretada 193 (Aa_39) e da COX3 (Aa_45) tiveram o mesmo perfil nas glândulas salivares e nos intestinos das fêmeas, enquanto os genes da proteína hipotética (Aa_14), da PDI (Aa_26), da proteína hipotética (Aa_42), da COX1 (Aa_47) e da proteína hipotética (Aa_53) tiveram perfis opostos nesses dois tecidos. Não foi detectada expressão da proteína hipotética (Aa_06) nem das proteínas com domínio de inibidor Kunitz-*type* nos intestinos. A infecção por *R. rickettsii* também induziu a expressão dos genes codificadores da hebraeína (Aa_20) e da PDI (Aa_26) nas glândulas salivares e no intestino de carrapatos machos (**Figura 4**). Como os genes codificadores das proteínas com domínio Kunitz-*type* (Aa_16 e Aa_25) são muito pouco expressos nas glândulas salivares de machos não infectados a determinação do seu perfil de modulação foi realizada por RT-qPCR absoluta. Observou-se que ambos os genes são induzidos pela infecção nas glândulas salivares de machos. Assim como observado nas fêmeas, os transcritos para essas proteínas não foram detectados no intestino de machos infectados ou não infectados.

Figura 3 - Análise do perfil de expressão gênica de fêmeas adultas de *A. aureolatum* infectadas com *R. rickettsii* por RT-qPCR.



Nota: A quantidade de cDNA nas amostras foi normalizada de acordo com a expressão da proteína ribossômica S3A e expressão relativa determinada utilizando a expressão de carrapatos não-infectados como controle. (A) Análise de expressão relativa em glândulas salivares de fêmeas. As setas indicam genes com o mesmo perfil de modulação obtido por SSH. (B) Análise de expressão relativa em intestinos de fêmeas. a, b e c: diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle pelo teste T de Student [a: ($p < 0,05$), b: ($p < 0,01$) e c: ($p < 0,001$)]. Aa_06, Aa_14, Aa_39, Aa_42 e Aa_53: proteína hipotética; Aa_15: citocromo b; Aa_16 e Aa_25: proteína com domínio Kunitz-type; Aa_20: hebraeína; Aa_26: PDI; Aa_27 e Aa_47: COX1; Aa_45: COX3.

Figura 4 - Análise do perfil de expressão gênica de carrapatos *A. aureolatum* machos infectados com *R. rickettsii* por RT-qPCR.

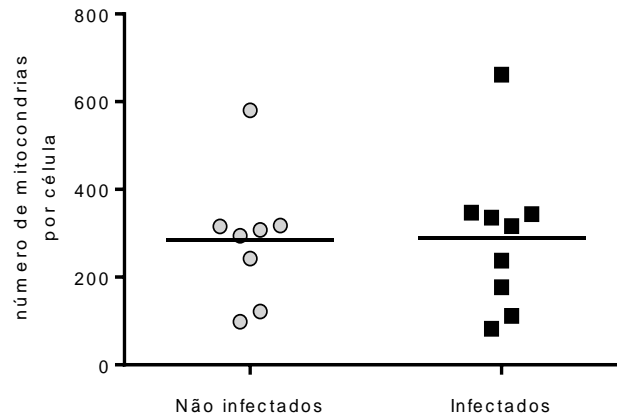


Nota: (A) Expressão relativa da hebraeína (Aa_20) e da PDI (Aa_26) em machos adultos por RT-qPCR. A quantidade de cDNA nas amostras foi normalizada de acordo com a expressão da proteína ribossômica S3A e a expressão relativa determinada utilizando a expressão de carrapatos não-infectados como controle. (B) Quantificação absoluta do número de cópias dos transcritos das proteínas com domínio de inibidor Kunitz-type (Aa_16 e Aa_25) por RT-qPCR. *: diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle pelo teste T de Student ($p < 0,05$).

4.3 Quantificação de mitocôndrias

Os dados de SSH e de RT-qPCR revelaram que genes codificadores de enzimas mitocondriais são induzidos pela infecção de *A. aureolatum* por *R. rickettsii*. Para avaliar se o aumento de transcritos estava relacionado ao aumento do número de mitocôndrias, determinamos o número dessas organelas por célula das glândulas salivares de fêmeas adultas infectadas e não infectadas através de qPCR absoluta. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no número de mitocôndrias por célula entre os dois grupos (**Figura 5**).

Figura 5 - Quantidade de mitocôndrias por células das glândulas salivares de fêmeas de *A. aureolatum* não infectadas e infectadas com *R. rickettsii*.



Nota: A barra horizontal indica a média dos valores.

4.4 Sequenciamento de nucleotídeos do cDNA da hebraeína e da proteína dissulfeto isomerase

Os genes codificadores da hebraeína (Aa_20), da PDI (Aa_26) e da proteína com domínio Kunitz-*type* (Aa_25), com expressão comprovadamente induzida pela infecção por *R. rickettsii*, foram selecionados para os experimentos de silenciamento gênico. Primeiramente, o cDNA das duas primeiras foi sequenciado de modo a ampliar a sequência de nucleotídeos previamente obtida pelo sequenciamento de preparações de plasmídeos de clones das bibliotecas subtrativas. A sequência de nucleotídeo do cDNA, obtido pelo sequenciamento da região 3'UTR (hebraeína e PDI) ou pelo sequenciamento de plasmídeos de clones das bibliotecas subtrativas (proteína com domínio Kunitz-*type*) foram utilizadas para deduzir as suas respectivas sequências de aminoácidos (**Figura 6**).

Figura 6 - Sequência de nucleotídeos do cDNA e sequência deduzida de aminoácidos da hebraína (A), da PDI (B) e da proteína com domínio Kunitz-*type* (C).

A

GTACAATAATCCGCTTTTCTACTTTTTGTAGATAGCCGTCACCTTGCTTCAGGTGAAAGGAAAGTATG
 GCCCGCTAGCCATGCGACACTGCTACTATAAACCGGACTCACTGGAGAAACTGATCACCACGTGCTGA
 AGGCATTACCGACGCTATATGGCATTGGAATGGACCACGAACGCCCTTCGAAATGAACGCAGAGCGTA
 GAGAGCAGACGCGGAACACAGCACTCCACTACCGCAAACAGGCCATATTTAAAGGGTATCTACGCGC
 ATTACGGCAGCATTGGTACGGGGGAACATACCTCCGAGCAGGTCTTGCTAGAGCGATAAAGCACTTC
 TCTCAGTGACCACTCACC**ATGAACGCTGTCTTCGCCTCCTGTCTGTT**CGTGGCCACCTTGGTGGCTGC
 M N A V F A S C L F V A T L V A A
 TGCTTCGGCTCATCAC**CTGGAGCTATGCAAGAAGACCGACCAGGTGCTGGCCACGGAGCTGGAATGCA**
 A S A H H L E L C K K T D Q V L A T E L E C
 TTAAGCAGCATATCCCCGCAACGACCAACGCTGCATTTGACGACGCTGTGCAGAAATTGAAGTGCAGC
 I K Q H I P A T T N A A F D D A V Q K L K C S
 GACCGCTCTTGCGCAATCCGTAAGATGTGCGAAGGAAACGACCTGGAGGGAGCCATGGCCAAGTTCTT
 D R S C A I R K M C E G N D L E G A M A K F F
 CACCACCGAGCAGATCAAGCACATCCACGATGCTTCCACTACTTGGCACCCTGACGCCACCACGGTC
 T T E Q I K H I H D A S T T C D P D A H H G
ACGACCACAGTCATGACCACGGCCACCATTAGAAAGGACAGGGTGCCCAAGATYTACGGCCACTC
 H D H S H D H G H H *
 CTTCTGTGATACCTCTATATGTTTTTTTTTCGCACGCGCTTAATGGAGTCAGAACGGCGCCCCACCTAA
 CGCTTGCAACGCACGGAAGATAATAAMCCTTTCGTAGTTATAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

B

ACAATGGCCCTCGGGAGGCCGGTGAATCGTCAAGCACATGCGGTACAGGTTGGACCCAGCTCCAAG
 GAATGCACGAGTGCCGAAGAAGCTTGCCAAGCTGCTCGAGAAGGACGAGGTGGTCATTGTTGGCTTCTT
 CGAAAACAAGGACGTTGACCTCCGCGAGCACTTCCCTCAAGATTGCTG**CAAGCAAAGGGAGACCTGGG**
 Q A K G D L G
TTTTGGCCACACTTTCAACAAGGACTTGCACAAGAAATACGGACACTCCAACAAAGTTGTGCTGTTC
 F G H T F N K D L H K K Y G H S N K V V L F
GGCCCAAGCTACTTAAGAACAAGTTTGAAGAGAATGAGGTGGCCTACGATGGCGCCGACACAAGTCT
 R P K L L K N K F E E N E V A Y D G A A D K S
 GCACTTGAGAAGTTCTTGAAGCAGAACTACCACGGCCTTGTGGTTCACAGGACTCAGGACAACCTACAA
 A L E K F L K Q N Y H G L V G H R T Q D N Y N
 CCAGTTGAGGCCCCGCTGTTGGTTGCCTACTTTCGATGTCGACTACACAAAGAACGCAAAGAGCACCA
 Q F E A P L L V A Y F D V D Y T K N A K S T
 ACTACTGGCGGAACCGGATCCTCAAGGTGGCCAGAACTACAAGGGCAAGCTGAACTTTGCCATCAGC
 N Y W R N R I L K V A Q N Y K G K L N F A I S
 AACAAGGACAGCTTTGCTGCTGAGATGGACGACTATGGCCTTTCCTCTCATGGAAACAAGCCTGTTGT
 N K D S F A A E M D D Y G L S S H G N K P V V
 CGGCGTCCGCAACGCTAACAACGAGAAGTCCGCATGACCAGTGAGTTCAGCGTGGAGAACCTGGAGA
 G V R N A N N E K F R M T S E F S V E N L E
 AGTTCCTCGAAGAGTACACTGCTGGCAAGGTCAAGGCACACCTCAAGTCGGAGCCAGTTCGGGAGAAT
 K F L E E Y T A G K V K A H L K S E P V P E N
 AACGATGGCCCTGTCAAGGTGGCCGTGGCTGAGAAGTTCAGGAGCTCGTCATGGAAAGCCCCAAGGA
 N D G P V K V A V A E N F K E L V M E S P K D
 TGTCCTRATTGAGTTCTATGCTCCATGGTGTGGCCACTGCAAGAAACTGGCACCTACTTACGAGGAAG
 V X I E F Y A P W C G H C K K L A P T Y E E
 TTGGCAAGACGCTTGCTGGCGAGGATGTGGAATTTGCAAGATGGATGCCACTGCCAATGATGTTTAC
 V G K T L A G E D V E I V K M D A T A N D V H
 CCCAAGTTTGAGGTCACAGGCTTCCCTACTTTGTACTGGGTGCCAAAGGATGACAAGGAGAACCCAAA
 P K F E V T G F P T L Y W V P K D D K E N P K
 GAGGTACGACGGTGGTCGTRACCATGATGATTTTCATCAAGTACATTGCCAAGCATGCCACCAGTGAGC
 R Y D G G R X H D D F I K Y I A K H A T S E

**TCAAGGGCTTTGACCGTTCTGGTGCAAAGAAGCCAAGGAGGAGTTATGAGGCATCATTGGGTCAGGA
L K G F D R S G A K K A K E E L ***
GGGACATTGTTTCTATCATTTCATTTGGGATCTCTGGGRTCTTTGTTCATCTCTGTACAATAAATGGAT
GTTTTTTTTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

C

ACGGGGGACACTTCTCTTGATCCGACTGCAAGATGAGTAGGGCGGCCTGTTTTGATTTTCTTGCTTGTC
GTGTTCTGCGGTTTCCTTCGTGCTGAGAAATAA**ATTTCCAAAGAGTGCCGGAACGATGGTCAAAATGA**
I S K E C R N D G Q N E
GTGTAAAATGCCAATGCGATGCATGTGTCTGAGCCTGGACCTCCCGGATACATTAGAGATTCCCTTT
C K M P M R C M C P E P G P P G Y I R D S L
TCTTCTTCAACCACACTTCATTTAAAATGCCAGCCATTTCGTGGCGAGGGTGACAGTTGCAACAGCTTC
F F F N H T S L K C Q P F V G E G D S C N S F
GGTGATTTAGAAGACTGCGAGGAATGCGAAGAAGTTGTCGTAAGGAAGTGATGCAAGGGTTATTGGGT
G D L E D C E E C E E V V V R K *
AAAATAAGGTTCTAAAGTAACCTTTTGTGCTCAACGATTCTCCAAAAGAGGTGTTT**TGGTGTTTA**
CCGGGGAAGTTCAAATCTAAAATAAATTACTTGCAAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Nota: A região codificadora de cada proteína está destacada em negrito. Em negrito e itálico, a região do peptídeo sinal da hebraeína. A sequência com fundo em cinza corresponde à região de associação dos oligonucleotídeos usados para a construção das dsRNA. Sublinhada, a região de associação dos oligonucleotídeos para avaliação do silenciamento gênico.

A análise da sequência de aminoácidos predita a partir da sequência de nucleotídeos do cDNA da hebraeína de *Amblyomma aureolatum* mostrou que o produto proteico possui 117 aminoácidos, dos quais os 20 primeiros correspondem ao peptídeo sinal (**Figuras 6 e 7**). Além disso, foi observada uma alta identidade com a hebraeína de *A. hebraeum* (86%) e com um peptídeo antimicrobiano rico em histidinas de *A. cajennense* (72%) (**Figura 7**). O peptídeo sinal, que encaminha para a via de secreção celular, revelou-se ser altamente conservado entre as três espécies analisadas. Além disso, a hebraeína de *A. aureolatum* apresenta uma região C-terminal rica em histidinas, a qual é característica dessa família de peptídeos antimicrobianos (FOGACA et al., 2004; LAI et al., 2004).

Figura 7 - Alinhamento das sequências de aminoácidos predita a partir do cDNA da hebraeína de *Amblyomma aureolatum* (Amblyom_a) com as sequências de *Amblyomma hebraeum* (Amblyom_h) e de *Amblyomma cajennense* (Amblyom_c).

```

Amblyom_a      MNAVFASCLFVATLVAAASAHHLELCCKKTDQVLATELECIKQHIPATTNAAFDDAVQKLK
Amblyom_h      MNAVFASCLIVAALVAFASAHHLELCCKKNDQVLATELECIKQHIPAETNAAFDEAVTKLQ
Amblyom_c      MNAVFACCLLLVAFVAAASAHHLELCCKKNDQVLAELEECIGNHIPSTNAAFDNAVKRLG
                *****.**:..:.* * *****.****** :***. *****:* * :*

Amblyom_a      CSDRSCAIRKMCEGNDLEGAMAKFFTTTEQIKHIHDASTTCDPDAHGHGHDHSHDHGH-H--
Amblyom_h      CSDRSCAIRKLCCEGNDLEGAMAKYFTPEQIKHVHDAALTCDPDARHDHDHGHGHDHGHGHDH
Amblyom_c      CSDRSCAMRKMCAAGDLEKAMSEFFT-VSMRLRNFLAICNRVK-----
                *****:*:* * *.*** **:::* * .: : : * :

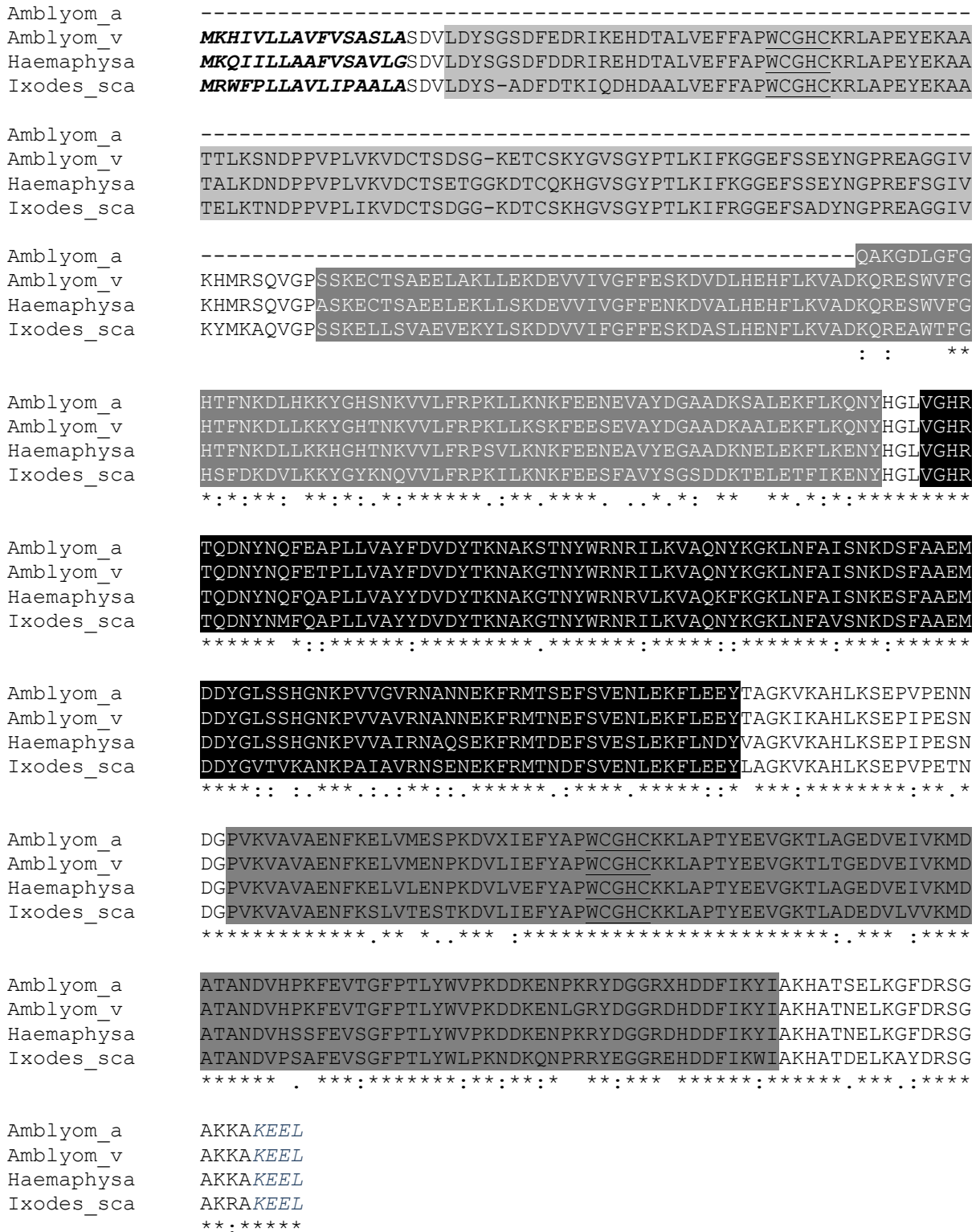
Amblyom_a      ---
Amblyom_h      DPH
Amblyom_c      ---

```

Nota: O peptídeo sinal está destacado em negrito e itálico.

A sequência parcial de aminoácidos predita do cDNA da PDI de *A. aureolatum* possui 170 resíduos, apresentando 94% de identidade com a PDI de *A. variegatum* (AvPDI) e 85% com a PDI de *Haemaphysales longicornis* (HIPDI-3) (**Figura 8**). Em linhas gerais, as PDIs possuem quatro domínios tiorredoxina, a, a', b e b' (KOZLOV et al., 2010). Desses quatro, apenas a e a' possuem o sítio ativo WCGHC, especificado genericamente entre as PDI como CXXC. Alguns autores denominam a região entre os domínios b' e a' de *x-linker* (LAURINDO et al., 2012). A região C-terminal possui uma extensão ácida ligante de cálcio (LAURINDO et al., 2012) e o motivo de retenção no retículo endoplasmático (RE), KEEL (KNIZETOVA et al., 2006). Já foi demonstrado que a menor parte de uma PDI funcional necessita no mínimo dos domínios b', a' e a região c (KOZLOV et al., 2010). Como a sequência de *A. aureolatum* não abrangeu a região N-terminal da proteína, o peptídeo sinal e o domínio a não estão representados. Na elaboração dos oligonucleotídeos, objetivou-se silenciar uma região PDI que abrangesse os domínios finais (b', a' e c-terminal), já que a proteína pode ser ativa somente com esses domínios.

Figura 8 - Alinhamento das sequências de aminoácidos predita a partir do cDNA da PDI de *Amblyomma aureolatum* (Amblyom_a) com as sequências de *Amblyomma variegatum* (Amblyom_v), *Haemaphysalis longicornis* (Haemaphysa) e *Ixodes scapularis* (Ixodes_sca).



Nota: O peptídeo sinal é apresentado em negrito e itálico; domínio a em cinza claro e letras em preto, domínio b em cinza claro e letras brancas, domínio b' em preto, domínio a' em cinza escuro e letras pretas. O sítio ativo está sublinhado e o motivo de retenção no RE (KEEL) em letras claras e itálico no final da sequência.

Uma proteína contendo domínio de inibidor Kunitz-*type* (Aa_25 ou Kun25), cuja indução da expressão foi confirmada por RT-qPCR, também foi selecionada para a caracterização funcional por RNAi. O domínio Kunitz/BPTI é normalmente constituído de uma sequência de cisteínas na forma de CX(8)CX(15)CX(7)CX(12)CX(3)C. Em carrapatos, podem ser encontrados domínios que apresentam deleções ou inserções, como CX(8)CX(18)CX(5)CX(12)CX(3)C e CX(5,6)CX(15)CX(8)CX(11)CX(3)C (DAI et al, 2012). A sequência de aminoácidos deduzida do cDNA da proteína Aa_25 possui um domínio que se enquadra nesse último tipo, com seis resíduos de cisteína e duas pontes dissulfeto (**Figura 9**). Na sequência silenciada na proteína com domínio Kunitz, trabalhou-se de modo que os oligonucleotídeos abrangessem apenas a região não conservada nesta família, de modo a não silenciar outras proteínas com domínios Kunitz, incluindo aquelas identificadas pelo presente trabalho (Aa_16).

Figura 9 - Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas do cDNA de proteínas de *A. aureolatum* com domínio Kunitz-*type* com sequências de outras espécies de carrapatos.

```

Haemaphy_1      CGFP-----ADPG--RCRASMPR-WFYNNSTSGHCEPFIYG-GCQGN--KNRFHSCWTCQR
Dermacento      CELE-----PDPG--ICRGLMLKK-WFYNSTSFRCETFYYG-GCLGN--ENKFDTIIECNK
Ixodes_sca      CSLS-----PEVG--RGRAHVRG-WVYDNTVKGKCSIFFFG-SAQGAPGENRFNSESECNK
ACAJ0015C       CRLP-----ADEG--ICRASIPR-YYFNPAEGKCSFFIYG-GCEGN--ENNFETIEECEK
Haemaphy_i      CKLP-----PHTG--PCKAAFWR-FYYNAAEGVCQPFLYG-GCQSN--GNNFETIEQCKQ
ACAJ1219S       CALE-----PERG--LCYAAFTL-YYFDAATGTCEEFLYG-GCGGN--ANRFGSLAEC--
amblyomin-     CNLP-----KLAGDETC SNKTEIRWYYNG--TACEAFIFK-GCGGN--DNNFDRVDDCQR
Boophilus       CREP-----IIKG--RCQVVNET-WYYSGLRRCLQQRNA-YCGGG--RNGFP----TEQ
Aa_16           CEMPQRCWCPEPGP-PGYDRQSL-YFFNLTTLQCQ-GYVG-DSNSC---NSFEDLDSC-E
Aa_25           CKMPMRCMCPEPGP-PGYIRDSL-FFFNHTSLKCQ-PFVG-EGDSC---NSFGDLEDC-E
Ac_06           CDYTEGCFCYPPFG-HGHNRIEG-YFYFPQHKKCIKPSQG-IGEGC---NSFEKKIDCLR
Ac_13           CDKE-----PDCP--RGKFINVI-FGFDPSTRLCSFYRWDGTGCPST--KNNFSTLDECIS
*               :   :   *   .   * *

```

```

Haemaphy_1      TC
Dermacento      KC
Ixodes_sca      VC
ACAJ0015C       TC
Haemaphy_i      AC
ACAJ1219S       --
amblyomin-     LC
Boophilus       LC
Aa_16           EC
Aa_25           EC
Ac_06           KC
Ac_13           KC

```

Nota: Proteínas com domínio Kunitz-*type* de *A. aureolatum* (Aa_16, Aa_25), *A. cajennense* [Ac_06 e Ac13, FOGACA, A.C, comunicação pessoal; amblyomin-X (amblyomin-) (BATISTA et al.,2010) e ACAJ0015C e ACAJ1219S (BATISTA et al., 2008), *Haemaphysalis longicornis* (Haemaphy_I e Haemaphy_i), *Dermacentor variabilis* (Dermacento), *Ixodes scapularis* (Ixodes_sca), *Rhipicephalus microplus* (Boophilus).

4.5 Silenciamento gênico

Primeiramente, avaliou-se a sobrevivência de carrapatos à microinjeção com o veículo das dsRNA (PBS estéril). Para tal, ninfas de *A. aureolatum* foram microinjetadas com 33 ou 69 nL de PBS estéril. Respectivamente, 100 e 80% das ninfas sobreviveram às injeções 72h após a inoculação, concluindo-se que o menor volume era o melhor para carrapatos deste estágio. Em seguida, dois grupos de ninfas foram microinjetadas, um com a dsRNA da hebraeína e outro com a dsRNA controle (MSP1). Após 36h, verificou-se uma mortalidade de aproximadamente 70% dos indivíduos de ambos os grupos. Com relação à expressão gênica da hebraeína, observamos um silenciamento de 87,75% no grupo injetado em relação ao grupo controle.

Uma vez que o silenciamento da hebraeína foi confirmado após a microinjeção com a respectiva dsRNA em ninfas, realizamos um experimento de silenciamento em carrapatos adultos. Dois grupos de carrapatos com 30 indivíduos cada (15 machos e 15 fêmeas) foram inoculados com a dsRNA para cada gene alvo [hebraeína (Aa_20 ou Heb), proteína dissulfeto isomerase (Aa_26 ou PDI) ou proteína com inibidor Kunitz-type (Aa_25 ou Kun25)], sendo cada grupo alimentado em um coelho infectado com *R. rickettsii*. Carrapatos microinjetados com a dsRNA para a MSP1 (controle) foram co-alimentados com os grupos dos genes alvo em cada coelho, utilizando-se, para tal, câmaras de alimentação independentes. Após 5 dias, 12 carrapatos de cada grupo (6 machos e 6 fêmeas) foram removidos da pele dos animais para a avaliação do nível do silenciamento gênico, bem como da aquisição da bactéria.

Observou-se um silenciamento de 98,75% da hebraeína e de 94,12% da PDI. Os transcritos da proteína com domínio Kunitz-type não foram detectados nos carrapatos do grupo microinjetado com sua dsRNA (Kun25), nem do grupo controle (MSP1). Sete de 12 carrapatos microinjetados com a dsRNA para a hebraeína (58,33%) e para a PDI (58,33%) adquiriram *R. rickettsii*, enquanto apenas dois de doze carrapatos do grupo controle (MSP1; 16,67%) foram colonizados (**Tabela 4**). O número de bactérias nas glândulas salivares de carrapatos dos grupos silenciados para a hebraeína e para a PDI também é uma ordem de grandeza maior que no grupo controle. Já em relação ao número de bactérias no intestino, o grupo silenciado para a hebraeína tem 100 vezes mais bactérias que o controle, enquanto

o grupo silenciado para a PDI tem 10 vezes menos bactérias que o controle (**Tabela 4**). Não foi observada nenhuma diferença no número de carrapatos que adquiriram *R. rickettsii*, nem no nível de infecção entre o grupo de carrapatos silenciados para a proteína com domínio de inibidor Kunitz-type (Kun25) e controle (MSP1).

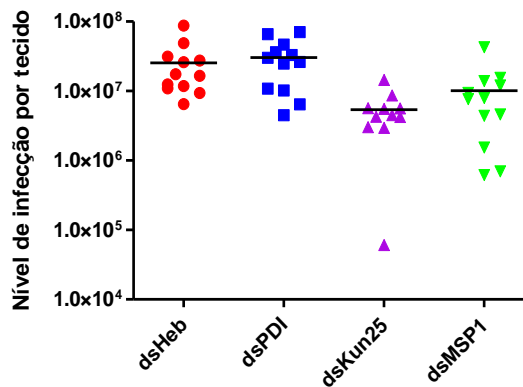
Tabela 4 – Número de riquetsias nas glândulas salivares e intestinos dos carrapatos que adquiriram a infecção após a administração das dsRNA para a hebraeína (Heb), proteína dissulfeto isomerase (PDI), proteína com domínio de inibidor Kunitz-type (Kun25) ou MSP1 (controle).

	Porcentagem de carrapatos infectados		Número de bactérias nas glândulas salivares dos carrapatos infectados		Número de bactérias no intestino dos carrapatos infectados	
	dsALVO	dsMSP1	dsALVO	dsMSP1	dsALVO	dsMSP1
Heb	58,33	16,67	3,83E+03 (±5,55E+03)	1,45E+02	6,74E+05 (±9,13E+05)	1,67E+03 (±6,59E+02)
PDI	58,33	16,67	2,38E+04 (±2,84E+04)	6,79E+03 (±2,96E+03)	6,82E+04 (±1,48E+05)	5,30E+05 (±1,76E+05)
Kun25	8,33	8,33	1,69E+03	3,10E+04	5,52E+05	1,85E+06

Nota: A detecção e quantificação do número de bactérias nos tecidos dos carrapatos foi determinada por qPCR com sonda TaqMan para o gene *gltA* de *R. rickettsii*.

Para avaliar os efeitos do silenciamento desses três genes na transmissão de *R. rickettsii*, carrapatos infectados foram microinjetados com as suas respectivas dsRNA e alimentados em coelhos. O número de riquetsias nas glândulas salivares dos carrapatos utilizados nos experimentos de transmissão foi determinado por qPCR com sonda TaqMan para o gene *gltA* de *R. rickettsii* (**Figura 10**), demonstrando que 100% dos carrapatos estavam, de fato, infectados e que possuíam um número similar de riquetsias.

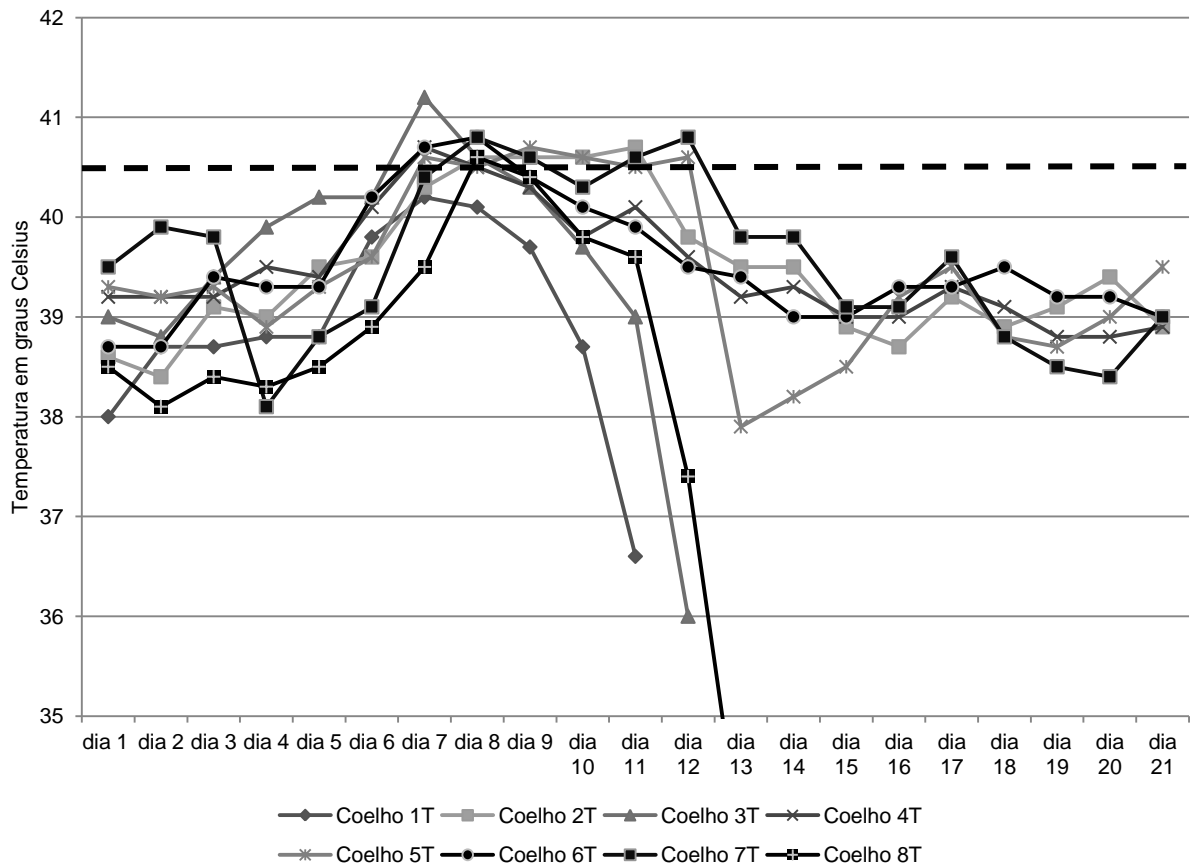
Figura 10 – Número de riquétsias nas glândulas salivares dos carrapatos utilizados no experimento de transmissão.



Nota: Cada ponto corresponde a um carrapato e a barra horizontal indica a média dos valores.

Para avaliar a transmissão de *R. rickettsii*, os coelhos utilizados para a alimentação dos carrapatos foram monitorados clinicamente pela aferição diária da temperatura corporal (**Figura 11**). Todos os coelhos apresentaram febre (temperatura acima de 40,5 °C), com duração de aproximadamente cinco dias. Alguns deles apresentaram ainda necrose testicular, sintomatologia característica da infecção por *R. rickettsii*. Além disso, três coelhos do vieram a óbito. Nesses coelhos, a duração do pico de febre foi menor, visto que a temperatura declinou pouco antes do óbito (**Figura 11**). Além da aferição da temperatura, o DNAg extraído de biópsias de pele dos animais antes (dia0) e após 8, 10 e 21 dias do início da alimentação dos carrapatos foi utilizado como molde em qPCR com sonda TaqMan para o gene *gltA* de *R. rickettsii* (**Tabela 5**). Foram detectadas riquétsias nos tecidos de seis dos oito coelhos em alguma fase da evolução da doença (**Tabela 5**). No entanto, os animais que não tiveram a infecção detectada por qPCR (coelhos 2 e 7) apresentaram um quadro sintomatológico clássico de febre maculosa, assegurando que estavam infectados. Em conjunto, esses dados indicam que o silenciamento dos genes não interferiu na transmissão de *R. rickettsii* para o hospedeiro vertebrado.

Figura 11 – Temperatura corporal dos coelhos utilizados para a alimentação de carrapatos infectados e microinjetados com dsRNA para a hebraeína, PDI, proteína com domínio de inibidor Kunitz-*type* ou MSP1.



Nota: A linha tracejada indica o valor a partir do qual é considerada febre em coelhos (40,5°C).

Tabela 5 - Número de riquetsias em biópsias de pele de coelhos antes e após diferentes tempos do início da alimentação de carrapatos infectados.

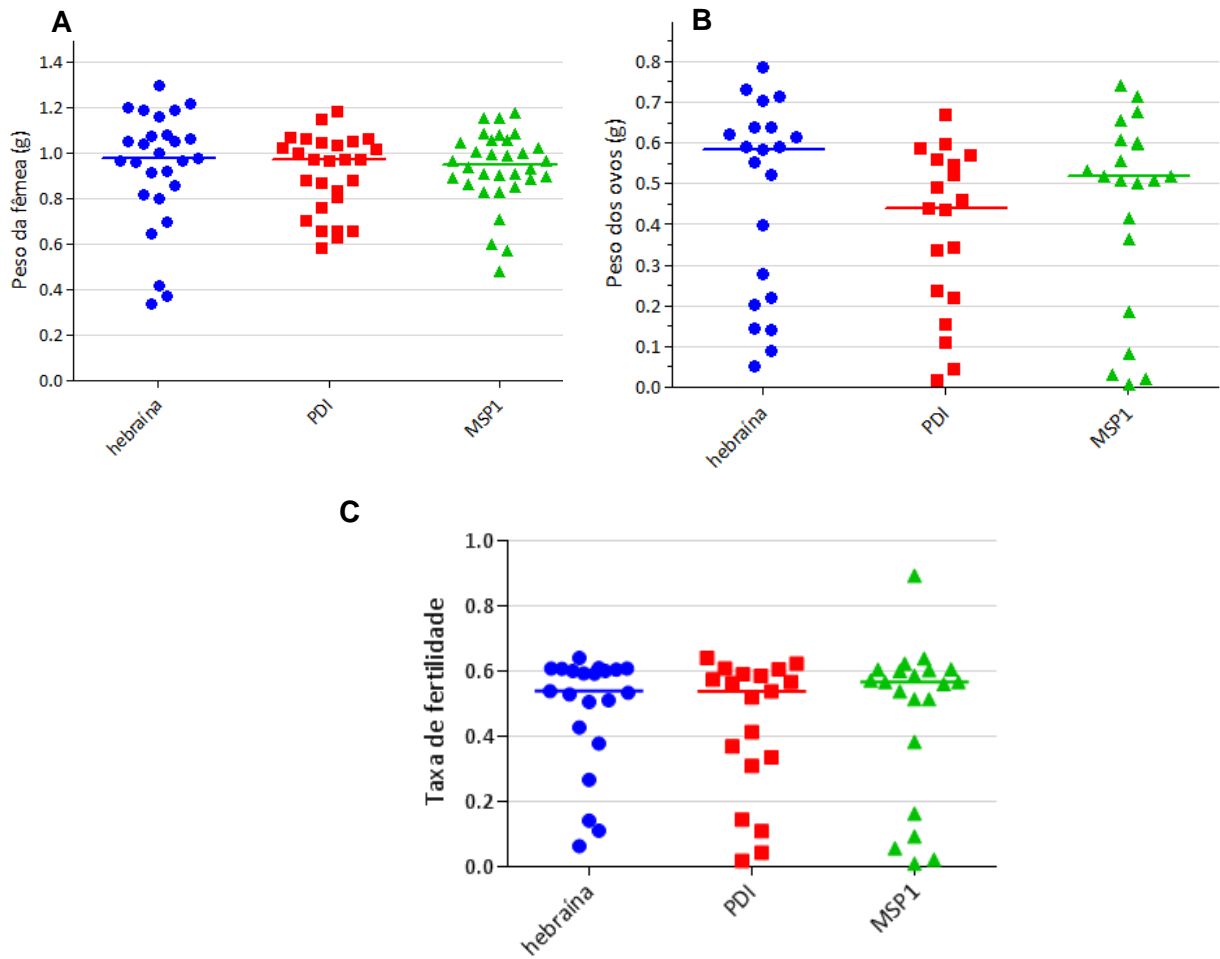
Transmissão	dia 0	dia 8	dia 10	dia 21
Coelho 1 (Heb)	sem detecção	sem detecção	1,31E+02	óbito
Coelho 2 (Heb)	sem detecção	sem detecção	sem detecção	sem detecção
Coelho 3 (PDI)	sem detecção	sem detecção	6,95E+01	óbito
Coelho 4 (PDI)	sem detecção	2,93E+01	sem detecção	sem detecção
Coelho 5 (Kun25)	sem detecção	2,80E+01	sem detecção	sem detecção
Coelho 6 (Kun25)	sem detecção	6,51E+01	sem detecção	óbito
Coelho 7 (MSP1)	sem detecção	sem detecção	sem detecção	sem detecção
Coelho 8 (MSP1)	sem detecção	sem detecção	sem detecção	3,18E+02

A hebraeína e a PDI, cujo silenciamento gênico ocasionou um aumento da susceptibilidade à *Rickettsia rickettsii*, foram selecionadas para a avaliação dos efeitos do silenciamento sobre o *fitness* dos carrapatos. O silenciamento gênico nas glândulas salivares das fêmeas injetadas com dsRNA da Heb e da PDI foi avaliado após 72 h, tendo sido observada uma diminuição de 99,64% e de 61,74%, respectivamente, em relação ao controle. Não foi observada nenhuma diferença significativa das taxas de sobrevivência após a alimentação em um cão (**Tabela 6**), nem no peso das fêmeas ingurgitadas, no peso da massa de ovos e na taxa de fertilidade entre os três grupos (**Figura 12**), demonstrando que o silenciamento da hebraína e da PDI não interferem, no *fitness* dos carrapatos.

Tabela 6 - Efeitos do silenciamento na sobrevivência dos carrapatos, após a microinjeção e após a alimentação, e a média de dias para o início da postura.

	Sobrevivência 24h após microinjeção	Sobrevivência após alimentação	Início da postura após queda (dias)
dsHeb	100%	90%	8 ($\pm 0,95$)
dsPDI	100%	90%	8 ($\pm 1,34$)
dsMSP1	100%	80,48%	8 ($\pm 0,83$)

Figura 12 - Avaliação do fitness das fêmeas ingurgitadas e silenciadas para a hebraína, proteína dissulfeto isomerase ou o gene controle MSP1.



Nota: Cada ponto no gráfico corresponde a um indivíduo avaliado. (A) Peso das fêmeas, em gramas. (B) Peso da massa de ovos, em gramas. (C) Taxa de fertilidade das fêmeas, determinada pela razão entre o peso da massa de ovos e o peso da fêmea que realizou a postura.

5 DISCUSSÃO

5.1 Expressão gênica diferencial devido à infecção de *Rickettsia rickettsii* em *Amblyomma aureolatum*

Rickettsia rickettsii é o agente causador da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, a mais letal das riquetsioses, sendo transmitida ao homem por diferentes espécies de carrapatos ixodídeos (DANTAS-TORRES, 2007; DANTAS-TORRES et al., 2012). No presente estudo, avaliamos, pela primeira vez, os efeitos da infecção por *R. rickettsii* sobre o perfil de expressão gênica de um vetor natural da bactéria, o carrapato *Amblyomma aureolatum* (LABRUNA et al., 2008).

Através da metodologia de hibridização subtrativa por supressão (SSH), duas bibliotecas subtrativas de cDNA foram obtidas, de modo a avaliar genes diferencialmente expressos em carrapatos infectados e não infectados. Treze genes modulados foram analisados por RT-qPCR. Dentre eles, o gene codificador de um peptídeo antimicrobiano (Aa_20) com similaridade com a hebraeína de *Amblyomma hebraeum* (LAI et al., 2004), foi confirmado como induzido pela infecção por *R. rickettsii*. Interessantemente, a indução do gene Aa_20 foi observada tanto nas glândulas salivares quanto nos intestinos de *A. aureolatum* fêmeas e machos. Os peptídeos antimicrobianos são moléculas citotóxicas produzidas por praticamente todos os grupos de organismos, atuando diretamente contra uma ampla diversidade de microrganismos (JENSSEN et al., 2006). Diversos peptídeos antimicrobianos já foram identificados em diferentes espécies de carrapatos (KOPACEK et al., 2010). A hebraeína é um peptídeo de 11,4 kDa, contendo 6 resíduos de cisteínas, uma região C-terminal rica em histidinas e predição de 4 a 6 α -hélices em sua estrutura secundária (LAI et al., 2004). A hebraína nativa e suas formas recombinantes apresentam atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, a Gram-negativa *Escherichia coli* e a levedura *Candida glabrato*, indicando que, possivelmente, possui um amplo espectro de ação (LAI et al., 2004). A hebraína é similar à microplusina, um peptídeo antimicrobiano de 10,2 kDa que foi isolado da hemolinfa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A expressão gênica da microplusina foi detectada em hemócitos, corpo gorduroso, ovários e ovos do carrapato (FOGACA et al., 2004; ESTEVES et al., 2009). Mais recentemente, foi demonstrado que a ação antimicrobiana da microplusina está

relacionada à sua propriedade de quelar íons de cobre (SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2011).

O gene codificador de uma proteína dissulfeto isomerase (PDI; Aa_26) também teve a indução de sua expressão gênica nas glândulas salivares de fêmeas de *A. aureolatum* validada por RT-qPCR. Esse gene também é induzido pela infecção nas glândulas salivares e intestino de machos, enquanto está reprimido no intestino das fêmeas. A formação de pontes de dissulfeto entre os corretos resíduos de cisteína durante o nascimento de polipeptídios no retículo endoplasmático é fundamental para assegurar o seu perfeito funcionamento. A PDI é uma chaperona redox do retículo endoplasmático, da superfamília da tiorredoxina (PUIG; GILBERT, 1994; WILKINSON; GILBERT, 2004). Foi previamente demonstrado que a PDI pode se translocar para o compartimento epi ou pericelular (epcPDI), no qual está relacionada à alteração do estado redox de diversas proteínas de membrana ou secretadas, que regulam diversos fenômenos, tais como coagulação, função plaquetária, adesão celular, proteólise, resposta imune e infecção viral (LAURINDO et al., 2012). Em carrapatos, uma PDI foi previamente identificada nas glândulas salivares de *Amblyomma variegatum* (KNIZETOVA et al., 2006). Já em *Haemaphysalis longicornis*, foram identificadas três PDIs (HIPDI-1, 2 e 3), as quais são induzidas pela alimentação sanguínea e pela infecção por *Babesia gibsoni* (LIAO et al., 2007). O silenciamento da HIPDI-1 afetou a alimentação e a oviposição dos carrapatos, enquanto o silenciamento da HIPDI-2 afetou a viabilidade dos mesmos (LIAO et al., 2008). No entanto, a relação do silenciamento das PDIs de *H. longicornis* com a infecção não foi estudada.

Ainda dentre os genes de *A. aureolatum* identificados por SSH como induzidos pela infecção, três codificam inibidores enzimáticos [Aa_16, Aa_25 e Aa_33 (proteínas com domínio de inibidor de serina-proteases Kunitz-type)]. Os inibidores enzimáticos podem prevenir infecções por patógenos que utilizam enzimas para a invasão dos tecidos do hospedeiro, aquisição de nutrientes e evasão do sistema imune (ARMSTRONG, 2001). A análise por RT-qPCR validou a modulação observada previamente por SSH para as sequências Aa_16 e Aa_25, enquanto a sequência Aa_33 não foi analisada. Interessantemente, os transcritos das proteínas com domínio Kunitz-type Aa_16 e Aa_25 não foram detectados no intestino de fêmeas e de machos, sugerindo que as mesmas sejam específicas das glândulas salivares. Os transcritos também foram detectados em níveis basais nas

glândulas salivares de fêmeas não infectadas e não foram detectados nas glândulas salivares dos machos. Dessa forma, para avaliar a modulação da expressão desses genes (Aa_16 e Aa_25) nas glândulas salivares de machos, utilizamos RT-qPCR absoluta, tendo sido observada a indução de ambas também em machos. A indução da síntese de uma família de inibidores Kunitz-type também foi observada infecção pelo protozoário *Babesia bovis* em ovários de *R. (B.) microplus* após a (RACHINSKY et al., 2007). Interessantemente, um inibidor Kunitz-type de *Dermacentor variabilis* apresentou uma atividade bacteriostática contra *R. montanensis* e possivelmente impede a invasão da célula hospedeira através de uma associação com a bactéria (CERAUL et al., 2008; CERAUL et al., 2011). Adicionalmente, foi demonstrado que o silenciamento gênico do inibidor Kunitz-type de *D. variabilis* aumenta em cerca de 90% a invasão por *R. montanensis* (CERAUL et al., 2011).

Diversas proteínas hipotéticas e/ou secretadas foram identificadas como moduladas pela análise por SSH [induzidas: Aa_06, Aa_13, Aa_19, Aa_22, Aa_39, Aa_42, Aa_44 e Aa_53; reprimidas: Aa_03, Aa_12, Aa_14, Aa_21 e Aa_38]. Os resultados obtidos pela análise de Aa_06, Aa_39, Aa_42, Aa_53 (induzidas pela infecção) e Aa_14 (reprimida pela infecção) por RT-qPCR foi contraditório ao previamente obtido por SSH. Por outro lado, a expressão das proteínas Aa_42 e Aa_53 foi induzida no intestino. Os transcritos da proteína hipotética Aa_06 não foram detectados no intestino, assim como os transcritos das proteínas com domínio Kunitz-type (Aa_16 e Aa_25). Apesar dos dados de modulação desse conjunto de proteínas não terem sido validados por qPCR, o seu estudo pode trazer conhecimento para o desenvolvimento de novas ferramentas para bloquear a transmissão do patógeno. Um exemplo notável é a proteína secretada pela saliva de *I. scapularis* P11 que auxilia na migração de *A. phagocytophilum* do intestino para as glândulas do carrapato (LIU et al., 2011). Também há uma proteína secretada da saliva de carrapatos do gênero *Ixodes*, a Salp15, que além de modular o sistema imune do hospedeiro vertebrado, liga-se à espiroqueta *B. burgdorferi*, protegendo o patógeno do ataque pelo sistema imune do hospedeiro (HOVIUS et al., 2007; MORI et al., 2010; RAMAMOORTHI et al., 2005).

Diversas sequências codificadoras de subunidades da enzima citocromo c oxidase (COX) de *A. aureolatum* foram identificadas como moduladas por SSH. Assim, as sequências Aa_27, Aa_45 e Aa_47, codificadoras de subunidades da COX, e também Aa_15, que codifica o citocromo b, foram selecionadas para a

validação dos dados por RT-qPCR. As sequências Aa_27 (COX1) e Aa_47 (COX1) foram validadas como induzidas pela infecção em glândulas salivares, sendo que Aa_27 também é induzida no intestino de fêmeas infectadas. As demais tiveram resultados opostos aos previamente obtidos por SSH. A indução da COX1 foi previamente observada em ovários de fêmeas de *R. (Boophilus) microplus* infectadas com *B. bovis* (RACHINSKY et al., 2007). Rudenko e colaboradores (2005) também mostraram que a infecção de carrapatos *Ixodes ricinus* com *Borrelia burgdorferi* leva à indução da COX1, sugerindo um aumento da atividade metabólica em resposta à infecção. Como a COX1, juntamente com as subunidades II (COX2) e III (COX3), é codificada por genes mitocondriais, os autores sugeriram que o aumento do número de transcritos poderia ser decorrente do aumento do número e/ou do tamanho das mitocôndrias pela infecção. No entanto, nossos dados demonstraram que o número de mitocôndrias nas glândulas salivares de *A. aureolatum* infectados ou não por *R. rickettsii* é igual, indicando que o aumento do número de transcrito da COX1 seja devido à indução de expressão gênica e não ao aumento do número de mitocôndrias. Além disso, a indução da COX1 pode estar associada com a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), deflagrada pela infecção. A cadeia respiratória mitocondrial resulta na redução do oxigênio a água, reação cujo catalisador é a citocromo c oxidase. Quando tal evento acontece com um vazamento de elétrons, em vez de unir quatro prótons e quatro elétrons a uma molécula de O₂, há a incorporação de apenas um elétron por vez, liberando formas parcialmente reduzidas de oxigênio (WEST et al., 2011).

5.2 Caracterização funcional da hebraeína (Aa_20), da proteína dissulfeto isomerase (Aa_26) e da proteína com domínio de inibidor Kunitz-type (Aa_25)

O RNA de interferência (RNAi) é uma técnica de silenciamento de genes amplamente empregada para a análise da função dos genes nos carrapatos (DE LA FUENTE et al., 2007; KOCAN et al., 2011). Experimentos de RNAi também podem fornecer informações valiosas sobre o envolvimento de genes de carrapatos no controle de infecções (ZIVKOVIC et al., 2010). No presente estudo nós avaliamos os efeitos do silenciamento de três genes distintos de *A. aureolatum*, um peptídeo antimicrobiano (hebraeína), uma proteína dissulfeto isomerase (PDI) e uma proteína

com domínio Kunitz-type (Kun25) na aquisição e transmissão da bactéria *R. rickettsii*. Além disso, a influência de dois desses genes (hebraeína e PDI) na sobrevivência do carrapato, ingurgitamento e oviposição também foi avaliada.

Como já descrito por muitos outros autores (KOCAN et al., 2011; LIAO et al., 2008; ZIVKOVIC et al., 2010), a microinjeção de duplas fitas de RNA (dsRNA) na hemocele de carrapatos revelou-se um excelente método para o silenciamento de genes. Obtiveram-se ótimos valores de sobrevivência dos carrapatos adultos em todos os experimentos. A mortalidade das ninfas, observada no experimento inicial, pode ser associada ao tempo prolongado que essas ninfas estavam sem se alimentar.

Conforme mencionado anteriormente, os peptídeos antimicrobianos são moléculas citotóxicas que agem contra vários microrganismos (JENSSEN et al., 2006). Vários deles já foram detectados como induzidos quando carrapatos são infectados com outros patógenos, mas nunca em carrapatos infectados com *R. rickettsii*. Ao silenciar a expressão gênica da hebraeína de *A. aureolatum*, não observamos diferenças no *fitness* do carrapato (sobrevivência, ingurgitamento e oviposição) alimentados em um cão. Esse resultado sugeriu que a hebraeína não desempenhe função em carrapatos não infectados. Também não observamos nenhum efeito do silenciamento da hebraeína na transmissão de *R. rickettsii* para coelhos. Por outro lado, um maior número de carrapatos adquiriu a bactéria pela alimentação quando a expressão gênica desse peptídeo foi silenciada. Esse resultado sugeriu que a hebraeína desempenhe um papel protetor contra a infecção do carrapato por essa bactéria.

As proteínas dissulfeto isomerase (PDIs) são necessárias para auxiliar o dobramento e montagem de proteínas, catalisando a formação de pontes dissulfeto no retículo endoplasmático (ER). Nos experimentos de silenciamento, não observamos diferença no *fitness* de *A. aureolatum* silenciados para a PDI. A PDI de *A. aureolatum* é similar à HIPDI-3 de *H. longicornis* (LIAO et al., 2007). Embora esse gene tenha sido induzido pela infecção com o parasita *Babesia gibsoni* (LIAO et al., 2007), seu silenciamento também não apresentou importantes alterações no *fitness* dos carrapatos (LIAO et al., 2008). Assim como observado para o silenciamento da hebraeína, não houve nenhum efeito do silenciamento da PDI na transmissão de *R. rickettsii* para coelhos. No entanto, também observamos um maior número de carrapatos que adquiriram a infecção.

As proteínas com domínios de inibidores de serina-proteases Kunitz-*type* podem realizar diferentes funções. Essas funções variam entre inibição da via extrínseca da coagulação sanguínea (CORRAL-RODRIGUES et al., 2009), inibição de canais iônicos (LUCCHESI; MOCZYDLOWSKI, 1991) e vasodilatação (PAESEN et al., 2009). Interessantemente, o silenciamento de um inibidor Kunitz-*type* de *Haemaphysalis longicornis* resultou em morte dos carrapatos durante a alimentação, falha no ingurgitamento, significativa redução no ganho de peso corporal, diminuição da taxa de oviposição e fecundidade (ALIM et al., 2012). Alguns Kunitz também estão envolvidos na defesa carrapato mecanismos contra a infecção pelo patógeno, presumivelmente através de inibição de proteases microbianas (SASAKI; TANAKA, 2008). De fato, o silenciamento de um inibidor Kunitz elevou o número de *R. montanensis* em carrapatos e células de carrapatos (CERAUL et al., 2008; CERAUL et al., 2011). A proteína com um domínio para inibidor Kunitz-*type* (Kun25) de *A. aureolatum*, induzida pela infecção por *R. rickettsii*, foi silenciada por RNAi. Intrigantemente, não observamos transcritos nos carrapatos infectados, silenciados ou não para o Kun25. Com isso, não foi possível confirmar o silenciamento gênico para Kun25. No entanto, nenhuma diferença foi observada pelo silenciamento no *fitness* dos carrapatos, nem na transmissão e aquisição de *R. rickettsii*. McNally e colaboradores (2012) levantaram a hipótese de que a evolução pode ter selecionado a expressão de diferentes proteínas com funções similares (por exemplo as proteínas com domínio tipo Kunitz podem possuir funções parecidas) na presença de um determinado patógeno. Assim, é possível que outras proteínas com domínio Kunitz tenham suprido o silenciamento da Kun25 (Aa_25), não sendo observada uma resposta expressiva no vetor ao ser silenciado com apenas um desses alvos. Assim, novos estudos com o silenciamento dessas proteínas em conjunto devem ser realizados.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo relata, pela primeira vez, os efeitos da infecção com *Rickettsia rickettsii*, cuja patogenicidade é a maior de seu grupo, sobre um vetor natural, *Amblyomma aureolatum*. Também é importante salientar que os carrapatos foram infectados por alimentação natural em seus hospedeiros infectados. Como *A. aureolatum* não possui genoma anotado e poucas sequências são conhecidas, esse trabalho também foi importante para somar informações de sequências disponíveis, tanto de proteínas hipotéticas como de proteínas com função previamente anotada. Importaneamente, os resultados obtidos por RNAi reforçam a importância de alguns dos genes na aquisição da bactéria pelo carrapato, possibilitando compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na resposta imunológica do carrapato à infecção. Em conjunto, os dados obtidos permitem estudos futuros, além dos já realizados aqui, em uma busca maior de alvos que interfiram com a aquisição e/ou transmissão de *R. rickettsii* e que possam ser considerados como alvos para o desenvolvimento de vacinas para a febre maculosa.

REFERÊNCIAS*

- ALJAMALI, M. N.; SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C. RNA interference: applicability in tick research. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 28, p. 89-96, 2002.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ARMSTRONG, P. B. The contribution of proteinase inhibitors to immune defense. **Trends Immunol.**, v. 22, p. 47-52, 2001.
- BATISTA, I. F.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARIA, F.; SIMONS, S. M.; BARROS-BATESTTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; LEO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Toxicon**, v. 51, p. 823-834, 2008.
- BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **J. Mol. Biol.**, v. 340, p. 783-795, 2004.
- BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 27, p. 573-580, 1999.
- BLANC, G.; OGATA, H.; ROBERT, C.; AUDIC, S.; SUHRE, K.; VESTRIS, G.; CLAVERIE, J. M.; RAOULT, D. Reductive genome evolution from the mother of *Rickettsia*. **PLoS Genet.**, v. 3, p. 14, 2007.
- BURGDORFER, W.; BRINTON, L. P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever *Rickettsiae* in ticks. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 266, p. 61-72, 1975.
- CERAUL, S. M.; CHUNG, A.; SEARS, K. T.; POPOV, V. L.; BEIER-SEXTON, M.; RAHMAN, M. S.; AZAD, A. F. A Kunitz protease inhibitor from *Dermacentor variabilis*, a vector for spotted fever group rickettsiae, limits *Rickettsia montanensis* invasion. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 321-329, 2011.
- CERAUL, S. M.; DREHER-LESNICK, S. M.; GILLESPIE, J. J.; RAHMAN, M. S.; AZAD, A.F. New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 1973-1983, 2007.
- CERAUL, S. M.; DREHER-LESNICK, S. M.; MULENGA, A.; RAHMAN, M. S.; AZAD, A. F. Functional characterization and novel rickettsiostatic effects of a Kunitz-type serine protease inhibitor from the tick *Dermacentor variabilis*. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 5429-5435, 2008.
- CHEN, L. F.; SEXTON, D. J. What's new in Rocky Mountain spotted fever? **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 415-432, vii-viii, 2008.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DANTAS-TORRES, F. Rocky Mountain spotted fever. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 7, p. 724-732, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends Parasitol.**, v. 28, p. 437-446, 2012.

DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; MANZANO-ROMAN, R.; NARANJO, V.; ALMAZAN, C.; PEREZ DE LA LASTRA, J. M.; ZIVKOVIC, Z.; JONGEJAN, F.; KOCAN, K. M. Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. **Genomics**, v. 90, p. 712-722, 2007.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, p. 6025-6030, 1996.

DIATCHENKO, L.; LUKYANOV, S.; LAU, Y. F.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. **Methods Enzymol.**, v. 303, p. 349-380, 1999.

DURHAM, A. M.; KASHIWABARA, A. Y.; MATSUNAGA, F. T.; AHAGON, P. H.; RAINONE, F.; VARUZZA, L.; GRUBER, A. EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. **Bioinformatics**, v. 21, p. 2812-2813, 2005.

EMBRAPA. Brazil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária c2010. Disponível em: <www.cnpma.embrapa.br/nova/mostra2.php?id=478> Acesso em: 1 abr. 2013.

ESTEVES, E.; FOGACA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F. D.; MANSO, P. P.; 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.**, v. 33, p. 913-919, 2009.

FLICEK, B. F. Rickettsial and other tick-borne infections. **Crit. Care. Nurs. Clin. North Am.**, v. 19, p. 27-38, 2007.

FOGACA, A. C.; LORENZINI, D. M.; KAKU, L. M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 28, p. 191-200, 2004.

GROB, D.; SCHÄFER, G. 100th Anniversary of the death of Ricketts: Howard Taylor Ricketts (1871-1910). The namesake of the Rickettsiaceae family. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 10-13, 2011.

HAYES, S. F.; BURGDORFER, W.; AESCHLIMANN, A. Sexual Transmission of Spotted Fever Group Rickettsiae by Infected Male Ticks: Detection of Rickettsiae in Immature Spermatozoa of *Ixodes ricinus*. **Infect. Immun.**, v. 27, p. 638-642, 1980.

HOVIUS, J. W.; LEVI, M.; FIKRIG, E. Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. **PLoS Med.**, v. 5, e43, 2008.

HOVIUS, J. W.; RAMAMOORTHY, N.; VAN'T VEER, C.; DE GROOT, K. A.; NIJHOF, A. M.; JONGEJAN, F.; VAN DAM, A. P.; FIKRIG, E. Identification of Salp15 homologues in Ixodes ricinus ticks. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 7, p. 296-303, 2007.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.**, v. 9, p. 868-877, 1999.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 491-511, 2006.

KALL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **J. Mol. Biol.**, v. 338, p. 1027-1036, 2004.

KNIZETOVA, P.; VANCOVA, I.; KOCAKOVA, P.; SLOVAK, M.; PROOST, P.; KOPACEK, J. New member of the protein disulfide isomerase (PDI) family identified in Amblyomma variegatum tick. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 36, p. 943-953, 2006.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; MANZANO-ROMAN, R.; NARANJO, V.; HYNES, W. L.; SONENSHINE, D. E. Silencing expression of the defensin, varisin, in male Dermacentor variabilis by RNA interference results in reduced Anaplasma marginale infections. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 46, p. 17-28, 2008.

KOCAN, K. M.; ZIVKOVIC, Z.; BLOUIN, E. F.; NARANJO, V.; ALMAZAN, C.; MITRA, R.; DE LA FUENTE, J. Silencing of genes involved in Anaplasma marginale-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in Dermacentor variabilis. **BMC Dev. Biol.**, v. 9, p. 42, 2009.

KOPACEK, P.; HAJDUSEK, O.; BURESOVA, V.; DAFFRE, S. Tick innate immunity. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 708, p. 137-162, 2010.

KOZLOV, G.; MAATTANEN, P.; THOMAS, D.Y.; GEHRING, K. A structural overview of the PDI family of proteins. **FEBS J.**, v. 277, p. 3924-3936, 2010.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **J. Mol. Biol.**, v. 305, p. 567-580, 2001.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D.H. 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.**, v. 42, p. 90-98, 2004.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; SOARES, J. F.; MARTINS, T. F.; SOARES, H. S.; MORAES-FILHO, J.; NIERI-BASTOS, F. A.; ALMEIDA, A. P.; PINTER, A.

Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 829-834, 2011.

LAI, R.; TAKEUCHI, H.; LOMAS, L. O.; JONCZY, J.; RIGDEN, D. J.; REES, H. H.; TURNER, P. C. A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. **FASEB J.**, v. 18, p. 1447-1449, 2004.

LAURINDO, F. R.; PESCATORE, L. A.; FERNANDES, D. C. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 52, p. 1954-1969, 2012.

LIAO, M.; BOLDBAATAR, D.; GONG, H.; HUANG, P.; UMEMIYA, R.; HARNNOI, T.; ZHOU, J.; TANAKA, T.; SUZUKI, H.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Functional analysis of protein disulfide isomerases in blood feeding, viability and oocyte development in *Haemaphysalis longicornis* ticks. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 38, p. 285-295, 2008.

LIAO, M.; HATTA, T.; UMEMIYA, R.; HUANG, P.; JIA, H.; GONG, H.; ZHOU, J.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Identification of three protein disulfide isomerase members from *Haemaphysalis longicornis* tick. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 37, p. 641-654, 2007.

LIU, L.; NARASIMHAN, S.; DAI, J.; ZHANG, L.; CHENG, G.; FIKRIG, E. *Ixodes scapularis* salivary gland protein P11 facilitates migration of *Anaplasma phagocytophilum* from the tick gut to salivary glands. **EMBO Rep.**, v. 12, p. 1196-1203, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MACALUSO, K. R.; MULENGA, A.; SIMSER, J. A.; AZAD, A. F. Differential expression of genes in uninfected and rickettsia-infected *Dermacentor variabilis* ticks as assessed by differential-display PCR. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6165-6170, 2003.

MACALUSO, K. R.; SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; AZAD, A. F. Infection and transovarial transmission of rickettsiae in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 1, p. 45-53, 2001.

MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J. B.; DERBYSHIRE, M. K.; DEWEESE-SCOTT, C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HAO, L.; HE, S.; HURWITZ, D. I.; JACKSON, J. D.; KE, Z.; KRYLOV, D.; LANCZYCKI, C. J.; LIEBERT, C. A.; LIU, C.; LU, F.; LU, S.; MARCHLER, G. H.; MULLOKANDOV, M.; SONG, J. S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R. A.; YIN, J. J.; ZHANG, D.; BRYANT, S. H. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, p. 237-240, 2007.

MARCHLER-BAUER, A.; PANCHENKO, A. R.; SHOEMAKER, B. A.; THIESSEN, P. A.; GEER, L. Y.; BRYANT, S. H. CDD: a database of conserved domain alignments

with links to domain three-dimensional structure. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 281-283, 2002.

MCNALLY, K. L.; MITZEL, D. N.; ANDERSON, J. M.; RIBEIRO, J. M.; VALENZUELA, J. G.; MYERS, T. G.; GODINEZ, A.; WOLFINBARGER, J. B.; BEST, S. M.; BLOOM, M. E. Differential salivary gland transcript expression profile in *Ixodes scapularis* nymphs upon feeding or flavivirus infection. **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 3, p. 18-26, 2012.

MELLO, C. C.; CONTE JR, D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, v. 431, p. 338-342, 2004.

MERCADO-CURIEL, R. F.; PALMER, G. H.; GUERRERO, F. D.; BRAYTON, K. A. Temporal characterisation of the organ-specific *Rhipicephalus microplus* transcriptional response to *Anaplasma marginale* infection. **Int. J. Parasitol.**, v. 41, p. 851-860, 2011.

MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biol. Ver. Camb. Philos. Soc.**, v. 86, p. 379-405, 2011.

MORI, A.; KONNAI, S.; YAMADA, S.; HIDANO, A.; MURASE, Y.; ITO, T.; TAKANO, A.; KAWABATA, H.; ONUMA, M.; OHASHI, K. Two novel Salp15-like immunosuppressant genes from salivary glands of *Ixodes persulcatus* Schulze tick. **Insect Mol. Biol.**, v. 19, p. 359-365, 2010.

PAROLA, P.; LABRUNA, M. B.; RAOULT, D. Tick-Borne Rickettsioses in America: Unanswered Questions and Emerging Diseases. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 11, p. 40-50, 2009.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 719-756, 2005.

PINTER, A.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 41, p. 324-332, 2004.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. **Vet. Parasitol.**, v. 105, p. 79-88, 2002.

PUIG, A.; GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase exhibits chaperone and anti-chaperone activity in the oxidative refolding of lysozyme. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 7764-7771, 1994.

QUEVILLON, E.; SILVENTOINEN, V.; PILLAI, S.; HARTE, N.; MULDER, N.; APWEILER, R.; LOPEZ, R. InterProScan: protein domains identifier. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. 116-120, 2005.

RACHINSKY, A.; GUERRERO, F. D.; SCOLES, G. A. Differential protein expression in ovaries of uninfected and Babesia-infected southern cattle ticks, Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 37, p. 1291-1308, 2007.

RAMAMOORTHY, N.; NARASIMHAN, S.; PAL, U.; BAO, F.; YANG, X. F.; FISH, D.; ANGUITA, J.; NORGARD, M. V.; KANTOR, F. S.; ANDERSON, J. F.; KOSKI, R. A.; FIKRIG, E. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. **Nature**, v. 436, p. 573-577, 2005.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 694-719, 1997.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol. Biol.**, v. 132, p. 365-386, 2000.

RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; EDWARDS, M. J.; GRUBHOFFER, L. Differential expression of Ixodes ricinus tick genes induced by blood feeding or Borrelia burgdorferi infection. **J. Med. Entomol.**, v. 42, p. 36-41, 2005.

SANTOS, A. S.; BACELLAR, F.; SANTOS-SILVA, M.; FORMOSINHO, P.; GRACIO, A. J.; FRANCA, S. Ultrastructural study of the infection process of Rickettsia conorii in the salivary glands of the vector tick Rhipicephalus sanguineus. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 2, p. 165-177, 2002.

SÃO PAULO. Secretaria de Saúde do Estado. [Internet]. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, c2012. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/>>. Acesso em: 20 maio 2013.

SILVA, F. D.; REZENDE, C. A.; ROSSI, D. C.; ESTEVES, E.; DYSZY, F. H.; SCHREIER, S.; GUEIROS-FILHO, F.; CAMPOS, C. B.; PIRES, J.R.; DAFFRE, S. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 34735-34746, 2009.

SILVA, F. D.; ROSSI, D. C.; MARTINEZ, L. R.; FRASES, S.; FONSECA, F. L.; CAMPOS, C. B.; RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D.; DAFFRE, S. Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against Cryptococcus neoformans. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 324, p. 64-72, 2011.

SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the tick Amblyomma cajennense, Cayenne tick, with Rickettsia rickettsii, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Med. Vet. Entomol.**, v. 26, p.139-151, 2012.

UETI, M. W.; REAGAN JR, J. O.; KNOWLES JR, D. P.; SCOLES, G. A.; SHKAP, V.; PALMER, G. H. Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of Anaplasma marginale. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 2959-2964, 2007.

WEST, A. P.; SHADEL, G. S.; GHOSH, S. Mitochondria in innate immune responses. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 389-402, 2011.

WILKINSON, B.; GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1699, p. 35-44, 2004.

ZDOBNOV, E. M.; APWEILER, R. InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**, v. 17, p. 847-848, 2001.

ZIVKOVIC, Z.; ESTEVES, E.; ALMAZAN, C.; DAFFRE, S.; NIJHOF, A. M.; KOCAN, K. M.; JONGEJAN, F.; DE LA FUENTE, J. Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 186, 2010.