

**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

## 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

MALOSSI, 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.

# 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

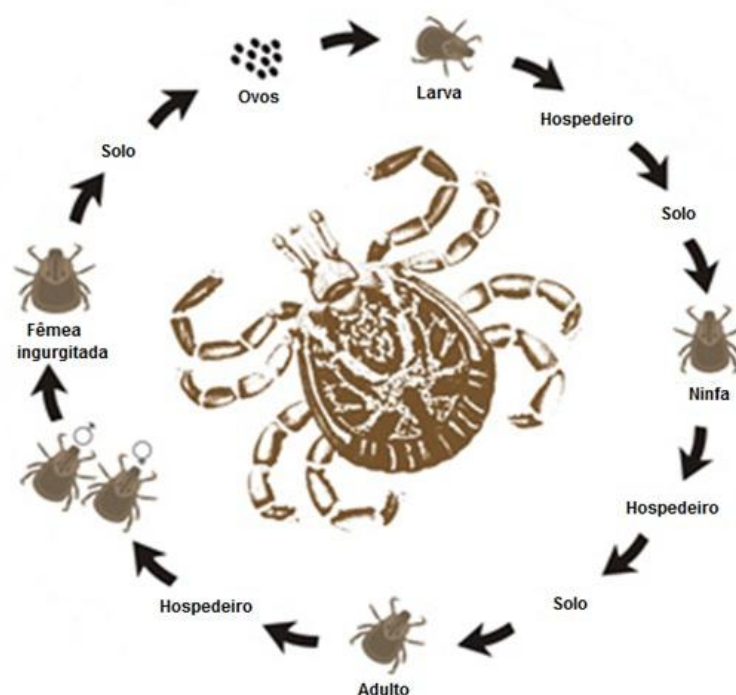
sua maioria, dependem da alimentação em três hospedeiros para completar seu ciclo de vida (são, portanto, trioxenos). Diferentemente dos argasídeos, carrapatos ixodídeos alimentam-se por períodos mais longos, de até três semanas. Como consequência do longo período de alimentação, nesta família encontram-se 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 ninfa. 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 ninfa, 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 glutational 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).

## 5 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](http://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<sup>-</sup>(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.