

LARISSA ALMEIDA MARTINS

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

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
2014

LARISSA ALMEIDA MARTINS

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação 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
2014

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

Martins, Larissa Almeida.

Efeitos da infecção por *Rickettsia rickettsii* sobre o perfil de expressão gênica do carrapato vetor *Amblyomma cajennense* / Larissa Almeida Martins. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Andréa 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 infection with *Rickettsia rickettsii* on the gene expression profile of the tick vector *Amblyomma cajennense*.

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

ICB/SBIB043/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Larissa Almeida Martins.

Título da Dissertação: Efeitos da infecção por *Rickettsia rickettsii* sobre o perfil de expressão gênica do carrapato vetor *Amblyomma cajennense*.

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

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

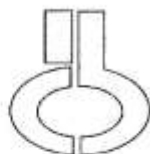
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Líneu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011)3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA-ICB/USP - 058/2011

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 128/11/CEUA, datado de 20.09.11 e por solicitação da Profa. Dra. Andréa Cristina Fogaça, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Larissa Almeida Martins** ao Projeto de Pesquisa "*Caracterização molecular das interações entre o carrapato-vetor e o agente etiológico da febre maculosa, Rickettsia rickettsii*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 15 de dezembro de 2011.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

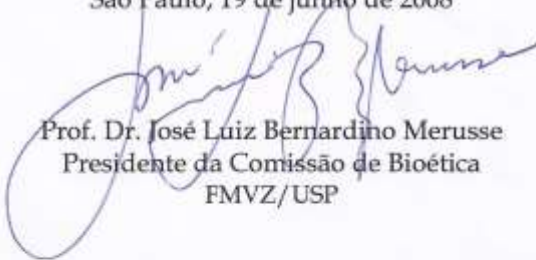


CERTIFICADO

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

Aos meus pais, pela compreensão, carinho,
apoio incansável e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Andréa Cristina Fogaça, pela confiança depositada em mim desde quando me conheceu durante a iniciação científica e pelo convite de fazer parte de seu grupo de pesquisa no Mestrado. Agradeço, e muito, a oportunidade e a confiança. Ainda mais, muito obrigada pela sua dedicação, por todo o aprendizado, orientação e por me proporcionar todo o crescimento pessoal e profissional. E, acima de tudo, pela sua amizade e a da “melhor amiga” Lorena.

A excelentíssima amiga Dra. Maria Fernanda Bandeira de Melo Galletti por ser essa pessoa mais que especial sempre pronta a ajudar. Faltam palavras para agradecer toda a ajuda “d-i-v-i-n-a”, ensinamentos, carinho, preocupação, conselhos, risadas e tudo mais... Obrigada pela compreensão, tolerância e paciência (obs.: muita paciência).

À Ms. Camila Malossi, que trocou o “grupo Rick” por um salário digno, décimo terceiro e férias! Muito obrigada por toda a ajuda, companheirismo além dos muitos ensinamentos e lições que com certeza levarei para toda a vida.

A todos a quem posso chamar de amigos do laboratório, cada um se tornou mais do que especial para mim. Muito obrigada por tudo que me ensinaram e tudo o que me ajudaram. Às Doutoradas Thais Bifano (mãe da Mel) e Paula Pohl (não chora!), as Mestres Sandra Kalil (cadê a animacao?) e Janaína Peixoto (7belo), ao IC Gustavo Zoppello (tipo assim...) e ao querido amigo que sempre ajudou para que não nos faltasse nada dentro do laboratório Mario Balanco (rosa mosqueta sempre!) e a Claudia Angeli. Assim como os amigos que seguiram suas carreiras, como o Prof. Dr. Rafael da Rosa (que pena!), obrigada pelos seus sábios conselhos e por ser um exemplo de profissional e à Dra. Eliane Esteves. Obrigada pelo convívio sempre repleto de muitas risadas agradeço todos os dias por poder contar com vocês, além de ser eternamente grata por todo carinho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Labruna pela colaboração neste projeto, por nos ceder espaço em seu biotério no VPS, sempre disposto a ajudar e auxiliar nos experimentos *in vivo*. Assim como toda a sua equipe, sem os quais este trabalho não seria realizado. Essa equipe em que muito deles se tornaram bons amigos, obrigada João Soares, Francisco Borges Costa, Herbert Soares, Tatiana Ueno, aos

técnicos Marcos e Pedrinho e aos demais amigos do VPS Andréa Costa, Amália Barbieri, Jonas Moraes e a amiga Uruguaia Paula Lado.

Ao Dr. Adriano Pinter que colaborou inúmeras vezes com o andamento, não apenas neste projeto, mas sempre auxiliou o grupo no que fosse preciso, nos cedeu espaço na SUCEN para a realização de alguns experimentos.

À Profa. Dra. Sirlei Daffre por toda a colaboração, confiança, por suas colocações e auxílio durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Arthur Gruber e seu grupo pelas análises de bioinformática.

Agradeço de forma especial a Profa. Dra. Tania Bijovsky por ter me permitido descobrir meu encantamento pela pesquisa, que sem dúvida surgiu enquanto estava em seu laboratório. Ao sempre amigo Dr. André Cardoso que sempre me ensinou, estimulou, apoiou e me deu o impulso para seguir em frente e que sem ele minha iniciação científica não teria acontecido obrigada por tudo. Assim como o apoio do grande amigo Alexandre Santos que me trouxe para esse mundo da pesquisa, sem vocês acredito que eu não estaria onde estou hoje.

Outra pessoa que merece um agradecimento é o Dr. André Luis da Costa da Silva, que sempre esteve pronto para ajudar em tudo que fosse preciso, desde mosquitos até carrapatos, muito obrigada pelos conselhos de sempre.

A todos os grandes amigos que tive a oportunidade de encontrar durante estes anos de ICB: Michele Barros, Albert Bressan, Ismael Sauter, Camilla Batista, Priscila Thihara, Cristiana Trinconi, André Luiz de Oliveira, Carlos Felipe Filietaz, Rafaella Ioshino, Danilo Carvalho, Ceres Maciel, Karina Costa, Fábio de Almeida, Cintia Yamashita (IB), Adne Abbud Righi, Angela Guillen (SUCEN) e muitas outras pessoas que sempre contribuíram e deixaram com certeza a vida mais alegre.

A todos os docentes e funcionários do departamento pelo convívio e a disposição em auxiliar sempre que preciso.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Capes pelo auxílio financeiro.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

Martins LA. Efeitos da infecção por *Rickettsia rickettsii* sobre o perfil de expressão gênica do carrapato vetor *Amblyomma cajennense*. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O agente etiológico da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (RMSF), conhecida no Brasil como Febre Maculosa Brasileira, é a bactéria *Rickettsia rickettsii*. Essa bactéria é transmitida ao homem pela picada de diferentes espécies de carrapatos ixodídeos. No Brasil, os vetores são *Amblyomma cajennense* e *A. aureolatum*. As taxas de prevalência de *R. rickettsii* nas populações de carrapatos de áreas endêmicas para RMSF são baixas, em geral abaixo de 1%. Essa baixa prevalência parece estar associada a menores taxas reprodutivas e de sobrevivência de linhagens infectadas, sugerindo que *R. rickettsii* seja patogênica também para os seus vetores. Infecções experimentais demonstraram que 80-100% dos indivíduos de uma colônia de *A. aureolatum* mantida em laboratório são infectados por *R. rickettsii*, enquanto apenas 10-60% de *A. cajennense* adquirem a bactéria. Esses dados indicam que as respostas dessas duas espécies de carrapatos à infecção sejam diferentes, resultando em diferentes taxas de prevalência da bactéria. Dessa maneira, a caracterização molecular das interações entre carrapatos do gênero *Amblyomma* e a bactéria *R. rickettsii* é importante, podendo gerar informações não somente para o esclarecimento acerca dos mecanismos de patogenicidade de *R. rickettsii* para os carrapatos, mas também para um melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pela aparente restringência de *A. cajennense* à infecção. Assim, os objetivos do presente estudo foram: (i) analisar os efeitos da infecção por *R. rickettsii* sobre o perfil de expressão gênica de carrapatos *A. cajennense* por hibridação subtrativa por supressão (SSH), (ii) validar os dados de SSH por reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa (RT-qPCR) e (iii) caracterizar funcionalmente dois genes com expressão induzida pela infecção por RNA de interferência (RNAi). Após a análise bioinformática dos dados de SSH, 44 sequências únicas foram obtidas, das quais 36 representam genes com expressão induzida e 8 genes com expressão reprimida pela infecção. A indução dos genes codificadores da subunidade I da citocromo c oxidase (COX1), da subunidade IV da NADH desidrogenase, de uma proteína com domínio de inibidor de serina-proteases Kunitz-type (papilina-like), identificados por SSH, e de um peptídeo antimicrobiano (hebraeína), foi confirmada por RT-qPCR. O silenciamento gênico da hebraeína e da papilina-like não teve nenhum efeito na aquisição de *R. rickettsii* pelo vetor, indicando que, isoladamente, não são responsáveis pela proteção de *A. cajennense* contra a infecção. Os dados gerados pelo presente estudo abrem perspectivas para que outros genes sejam avaliados quanto ao seu papel na aquisição de *R. rickettsii*, os quais, no futuro, podem ser considerados como alvos para o desenvolvimento de vacinas.

Palavras-chave: Transcriptoma. Hibridação subtrativa por supressão (SSH). RNA de interferência (RNAi). Carrapato. *Amblyomma cajennense*. *Rickettsia rickettsii*.

ABSTRACT

Martins LA. Effects of infection with *Rickettsia rickettsii* on the gene expression profile of the tick vector *Amblyomma cajennense*. [Masters thesis (Biology of Host-Pathogen Interactions)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The etiologic agent of the Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF), also known as Brazilian Spotted Fever in Brazil, is the bacterium *Rickettsia rickettsii*. This rickettsia is transmitted to humans by the bite of various tick species. In Brazil, *Amblyomma cajennense* and *A. aureolatum* are known as vectors. The prevalence rates of *R. rickettsii* infected ticks in RMSF endemic areas are low, oscillating around 1%. These low prevalence rates seems to be associated with lower reproductive and survival rates of infected ticks, suggesting that *R. rickettsii* is also pathogenic to its vectors. Experimental infections with *R. rickettsii* have demonstrated that 80 to 100% of *A. aureolatum* ticks from a laboratory colony acquire this bacterium, whereas only 10 to 60% of *A. cajennense* ticks become infected. These results indicate that the responses of these two tick species against infection are different, resulting in different prevalence rates of the bacterium. Therefore, the elucidation of the interactions between ticks of the genera *Amblyomma* and the bacterium *R. rickettsii* at a molecular level is important to provide information to better understand the mechanisms of pathogenicity of *R. rickettsii* against ticks as well as for the elucidation of the mechanisms responsible for the apparent refractoriness of *A. cajennense* against infection. Therefore, the objectives of the current study were: (i) analyze the effects of the infection with *R. rickettsii* on the gene expression of ticks *A. cajennense* by suppression subtractive hybridization (SSH), (ii) validate SSH data by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and (iii) functionally characterize two genes induced by infection using RNA interference (RNAi). After bioinformatics analysis of SSH data, 44 unique sequences were obtained, among which 36 represent genes with expression induced and 8 repressed genes by infection. The induction of genes encoding subunit I of cytochrome *c* oxidase (COX1), the NADH dehydrogenase subunit IV, a protein containing Kunitz-type inhibitor domain (papilin-like), identified by SSH, and an antimicrobial peptide (hebraein), was confirmed by RT-qPCR. The effects of knockdown of hebraein and papilin-like encoding genes had no effect on the acquisition of *R. rickettsii* by the vector. Data of the current study may be used to evaluate the role of other genes in acquisition of *R. rickettsii*, which, in the future, may be considered as target for vaccine development.

Keywords: Transcriptome. Suppression subtractive hybridization (SSH). RNA interference (RNAi). Tick. *Amblyomma cajennense*. *Rickettsia rickettsii*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Amblyomma cajennense</i>	22
Figura 2. Interações entre patógenos, carrapatos e o hospedeiro vertebrado.....	26
Figura 3. Análise do perfil de expressão gênica de fêmeas adultas de <i>A. cajennense</i> infectadas com <i>R. rickettsii</i> avaliada por RT-qPCR.....	48
Figura 4. Silenciamento gênico do PAM hebraeína por RNA de interferência (RNAi).....	50
Figura 5. Alinhamento das sequências de aminoácidos das hebraeína de <i>A. hebraeum</i> e <i>A. cajennense</i>	56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Adaptadores de supressão utilizados na construção das populações *tester* das bibliotecas subtrativas de cDNA.....35
- Tabela 2.** Oligonucleotídeos específicos para os genes de *A. cajennense* selecionados para a validação por RT-qPCR.....39
- Tabela 3.** Oligonucleotídeos específicos dos genes de *A. cajennense* selecionados para o silenciamento por RNAi e para a avaliação do silenciamento por RT-qPCR.....39
- Tabela 4.** Quantificação da infecção por *R. rickettsii* nas glândulas salivares e intestinos de fêmeas.....44
- Tabela 5.** Similaridade entre as sequências representando genes de *A. cajennense* com expressão induzida nas glândulas salivares pela infecção por *R. rickettsii* e sequências disponíveis em bancos públicos de dados.....46
- Tabela 6.** Similaridade entre as sequências representando genes de *A. cajennense* com expressão reprimida nas glândulas salivares pela infecção por *R. rickettsii* e sequências disponíveis em bancos públicos de dados.....47

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

µL – microlitro

µg – micrograma

AcC – *Amblyomma cajennense* Controle

AcI – *Amblyomma cajennense* Infectado

BPTI – inibidor de tripsina pancreática bovina

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* (Centros para o Controle e Prevenção de Doenças)

cDNA – ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar

COX – citocromo *c* oxidase

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNAg – DNA genômico

dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfatado

dsRNA – ácido ribonucleico (RNA) dupla fita

DvKPI – inibidor Kunitz-*type* de *D. variabilis*

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

EUA – Estados Unidos da América

FMB – Febre Maculosa Brasileira

GST – glutationa S-transferase

h – horas

HBP – proteínas ligantes de histamina

IDE8 – linhagem celular de carrapatos *Ixodes scapularis*

LPS – lipopolissacarídeos

M – molar

min – minutos

mL – mililitro

mM – milimolar

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida

ng – nanograma

nL – nanolitro

nmol – nanomol

OMS – Organização Mundial de Saúde
PAM – peptídeo antimicrobiano
PAMP – padrões moleculares associados a patógenos
pb – pares de bases
PBS – salina em tampão fosfato
PCR – reação em cadeia de polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
p/v – peso por volume
RIFI – reação de imunofluorescência indireta
RMSF – *Rocky Mountain Spotted Fever* (Febre Maculosa das Montanhas Rochosas)
RNA – ácido ribonucleico
RNAi – RNA de interferência
RNAseq – sequenciamento de última geração
RT – transcrição Reversa
RT-PCR – reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa
RT-qPCR – reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real precedida por transcrição reversa
s – segundos
SFG – grupo da febre maculosa
SP – São Paulo
SSH – hibridação subtrativa por supressão
TG – grupo do tifo
Tris – Tris (hidroximetilaminometano)
U – unidades
UR – umidade relativa
V – Volt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Febre Maculosa: histórico, epidemiologia e etiopatogenia	18
1.2 <i>Rickettsia rickettsii</i>: o agente etiológico	20
1.3 Os carrapatos vetores	21
1.4 <i>R. rickettsii</i> e hospedeiros amplificadores	23
1.5 <i>R. rickettsii</i> e carrapatos vetores	24
1.6 A aquisição e a transmissão de riquetsias por carrapatos	25
1.7 Análises transcricionais	27
1.8 Análises funcionais	29
2 OBJETIVOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 <i>Rickettsia rickettsii</i>	32
3.2 <i>Amblyomma cajennense</i>	32
3.3 Infecção experimental de carrapatos	32
3.4 Dissecção de glândulas salivares e intestinos	33
3.5 Extração de ácidos nucleicos	34
3.6 Determinação dos níveis de infecção por <i>R. rickettsii</i> por PCR quantitativa (qPCR)	34
3.7 Construção de bibliotecas subtrativas de cDNA	35
3.7.1 Síntese de cDNA e digestão com endonuclease <i>Rsa I</i>	35
3.7.2 Hibridação subtrativa por supressão	35
3.7.3 Construção das bibliotecas AcC e Acl-específicas	36
3.7.4 Análise das bibliotecas de cDNA para a identificação de clones específicos de cada biblioteca	36
3.7.4.1 Varredura diferencial	36

3.7.4.2 Northern Blot virtual.....	37
3.8 Sequenciamento.....	37
3.9 Anotação das bibliotecas subtrativas de cDNA.....	37
3.10 Desenho e síntese de oligonucleotídeos.....	38
3.11 Síntese de cDNA.....	39
3.12 Teste dos oligonucleotídeos por PCR convencional.....	40
3.13 Determinação da eficiência dos oligonucleotídeos por RT-qPCR.....	40
3.14 Validação dos dados obtidos pela hibridização subtrativa por PCR quantitativa precedida por transcrição reversa (RT-qPCR).....	41
3.14.1 Reação de pré-amplificação.....	41
3.14.2 qPCR.....	41
3.15 Silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi).....	42
3.15.1 Síntese de dsRNA.....	42
3.15.2 Administração das dsRNA aos carrapatos, dissecação e extração de material genético.....	43
3.15.3 Avaliação da eficiência do silenciamento gênico por RT-qPCR.....	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Obtenção de carrapatos <i>A. cajennense</i> adultos infectados com <i>R. rickettsii</i>.....	44
4.2 Análise dos efeitos da infecção sobre o perfil de expressão gênica nas glândulas salivares de <i>A. cajennense</i> por SSH.....	44
4.3 Validação dos dados de SSH por RT-qPCR.....	47
4.4 Análise dos efeitos do silenciamento gênico da hebraeína e do inibidor Kunitz-type (Ac_06) na aquisição de <i>R. rickettsii</i>.....	48
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS*.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Febre Maculosa: histórico, epidemiologia e etiopatogenia

O primeiro relato clínico da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (*Rocky Mountain Spotted Fever, RMSF*) é do ano de 1899 em Idaho, estado norte-americano localizado na região das Montanhas Rochosas. Nesse relato, Edward E. Maxey descreveu a RMSF como uma doença febril grave, caracterizada por um período contínuo de febre alta e pelo aparecimento de erupções purpúreas na pele (Dantas-Torres, 2007; Parola et al., 2005). Anos mais tarde, carrapatos do gênero *Dermacentor* foram incriminados como vetores da infecção. Em 1906, Howard Taylor Ricketts, patologista americano, isolou a bactéria associada à moléstia, a qual foi denominada *Rickettsia rickettsii* (Chen, Sexton, 2008). Nos anos seguintes, Howard T. Ricketts, juntamente a outros pesquisadores, descreveram as bases clínicas e os fatores epidemiológicos da doença (Chen, Sexton, 2008).

A partir da década de 1930, a doença passou a ser identificada em diversos países de todo o continente americano (Dantas-Torres, 2007; Labruna, 2009). Casos de RMSF já foram reportados no Canadá, Estados Unidos (Chapman et al., 2006), México (Zavala-Castro et al., 2006), Costa Rica (Fuentes, 1979; Hun et al., 2008), Panamá (Estripeaut et al., 2007), Colômbia (Hidalgo et al., 2007), Argentina (Paddock et al., 2008; Ripoll et al., 1999) e Brasil (Angerami et al., 2006a, 2006b; de Lemos et al., 2002; Galvão et al., 2005). No Brasil, o primeiro caso da doença foi descrito em 1929 por José Toledo Piza no Estado de São Paulo, que a denominou de “Tifo Exantemático de São Paulo”. Mais tarde, a doença também foi identificada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Rio de Janeiro (Greca et al., 2008). Em 1933, estudos indicaram a imunidade cruzada entre o agente etiológico do tifo de São Paulo e da RMSF, concluindo-se que ambos correspondiam à mesma bactéria. Assim, a doença ficou conhecida no Brasil como Febre Maculosa Brasileira (FMB) (Greca et al., 2008). Desde o final dos anos 80 até os dias de hoje, a FMB é considerada uma doença reemergente e em expansão, tendo sido 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.

As maiores taxas de incidência da FMB concentram-se na região sudeste (Labruna, 2009; Szabó et al., 2013), justamente a mais populosa do país. No período de 1985 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 do estado. A maior incidência foi ao longo do ano de 2012, com 68 casos confirmados, dos quais 37 resultaram em mortes (54% de taxa de mortalidade) (dados oficiais da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo - <http://www.cve.saude.sp.gov.br>). Em conjunto, esses dados destacam a FMB como a doença transmitida por vetores com a mais alta taxa de fatalidade no sudeste do Brasil.

R. rickettsii é transmitida ao homem e a outros vertebrados por diferentes espécies de carrapatos ixodídeos. As espécies de carrapatos vetores variam de acordo com a região afetada pela doença. Na América do Norte, os principais vetores são *Dermacentor variabilis* e *Dermacentor andersoni*, mas a bactéria também pode ser transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma americanum* (Dantas-Torres et al., 2012; Flicek, 2007; Parola et al., 2005). No Brasil, as espécies transmissoras da bactéria são *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma cajennense* (Dantas-Torres, 2007; Dantas-Torres et al., 2012). Após um período de incubação de aproximadamente sete dias após a picada do carrapato infectado, sintomas como mal-estar, calafrios, febre, cefaleia e mialgia podem ocorrer. As petéquias ou máculas, que nomeiam a doença, aparecem no estágio avançado e, muitas vezes, são de difícil visualização ou nem ocorrem. Por serem inespecíficos, os sintomas da FMB são facilmente confundidos com os de viroses e de outras infecções bacterianas, dificultando o diagnóstico clínico (Chen, Sexton, 2008; Raoult, Roux, 1997). Assim, o diagnóstico laboratorial é o mais indicado, mas, muitas vezes, não chega a ser realizado, sendo provável que o número de casos de FMB seja ainda maior (Dantas-Torres, 2007). O exame laboratorial recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) é o teste sorológico, onde 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 a 10 dias de infecção, o que limita o diagnóstico precoce da doença (Dantas-Torres, 2007). A utilização de PCR é limitada devido à baixa sensibilidade de detecção de DNA de *R. rickettsii* em amostras de sangue, pois o número de riquetsias

circulantes no sangue é geralmente baixo, já que *R. rickettsii* possui um tropismo por células endoteliais (Blanton, 2013). Dessa forma, essa técnica é utilizada apenas para a detecção da bactéria em biópsias de pele ou tecido de necropsia. Assim, apesar de a infecção poder ser sanada com poucas doses de antibióticos orais, a RMSF ainda causa significativa morbidade e mortalidade, o que muitas vezes está relacionado ao seu diagnóstico tardio (Chen, Sexton, 2008; Dantas-Torres, 2007).

1.2 *Rickettsia rickettsii*: o agente etiológico

O gênero *Rickettsia* (ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae) é composto por um grupo de α -proteobactérias estritamente intracelulares que causam doenças em humanos e em outros animais e que são transmitidas por vetores (Merhej, Raoult, 2011). As espécies desse gênero estão subdivididas em dois grupos principais: o grupo tifo (*typhus Group* - TG) e o grupo febre maculosa (*spotted fever group* - SFG). *Rickettsia rickettsii* pertence ao SFG juntamente com mais 19 espécies, dentre as quais é a mais patogênica (Chen, Sexton, 2008; Parola et al., 2009).

R. rickettsii é um cocobacilo pleomórfico Gram negativo, apresentando tamanho reduzido (0,2–0,5 μm de diâmetro por 0,3–2,0 μm de comprimento). Diferentemente de outros patógenos intracelulares, essa bactéria vive livremente no citoplasma ou no núcleo da célula hospedeira, ou seja, sem um vacúolo parasitóforo ao seu redor (Chen, Sexton, 2008).

R. rickettsii possui duas principais proteínas imunodominantes em sua superfície, uma de 190 kDa (proteína da membrana externa A, OmpA) e outra de 135 kDa (proteína de membrana externa B, OmpB), sendo a OmpB a mais abundante. Por apresentarem epítomos espécies-específicos, OmpA e OmpB fornecem bases para a sorotipagem de riquetsias através de ensaios comparativos por RIFI (Dantas-Torres, 2007; Parola et al., 2005).

No hospedeiro vertebrado, *R. rickettsii* infecta as células do endotélio e paredes de vasos (Flicek, 2007), enquanto no vetor invertebrado, infecta todos os tecidos (Burgdorfer, Brinton, 1975; Macaluso et al., 2001). Esse patógeno também é capaz de infectar diversos tipos de células em cultivo, tais como células Vero (provenientes de rim de macaco verde africano), L929 (fibroblastos de

camundongo), MRC5 (fibroblastos de pulmão humano), além de células embrionárias de carrapatos (Dantas-Torres, 2007).

1.3 Os carrapatos vetores

Os carrapatos são atualmente considerados o segundo principal grupo de artrópodes vetores de doenças infecciosas para humanos em todo o mundo, sendo superados apenas pelos mosquitos (Socolovschi et al., 2009). Isso se deve ao fato de que todas as espécies de carrapatos conhecidas, cerca de 900, necessitam de sangue para o seu desenvolvimento e reprodução, parasitando diversas classes de vertebrados em quase todas as regiões do mundo (Barker, Murrell, 2004).

De acordo com características morfológicas e fisiológicas, os carrapatos são classificados em duas principais famílias: Argasidae e Ixodidae. Os argasídeos, conhecidos como “carrapatos moles”, apresentam fases parasitárias curtas, alimentando-se de horas a poucos dias sobre o hospedeiro vertebrado. Geralmente habitam ambientes restritos, tais como cavernas, tocas e ninhos, sendo que algumas espécies estão associadas à presença de morcegos (Dantas-Torres et al., 2012; Guglielmone et al., 2010; Labruna, Venzal, 2009). Diferentemente dos argasídeos, os ixodídeos, conhecidos como “carrapatos duros”, alimentam-se por períodos mais longos, podendo chegar até três semanas de alimentação sobre seus hospedeiros. Como consequência deste longo período de alimentação, uma grande diversidade de patógenos pode ser transmitida ao hospedeiro durante o repasto sanguíneo (Dantas-Torres et al., 2012; Kopáček et al., 2010).

O carrapato *A. aureolatum*, popularmente conhecido como “carrapato-amarelo-do-cão”, é um carrapato ixodídeo encontrado em alguns países da América do Sul, além da região neotropical do Brasil. Essa espécie habita principalmente as 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). Importaneamente, *A. aureolatum* foi incriminado como transmissor de *R. rickettsii* na região metropolitana de São Paulo (Parola et al., 2009; Pinter, Labruna, 2006). Já o carrapato *A. cajennense*, alvo do presente estudo, é o principal vetor de *R. rickettsii* não apenas no Brasil, mas em toda a América Latina (Estrada-Peña et al., 2004; Parola et al., 2005, 2009; Szabó et al., 2013). *A. cajennense* é

popularmente conhecido como “carrapato-estrela” ou “carrapato-de-cavalo”. Por ser um carrapato de tocaia, acumula-se aos montes nas pontas de galhos ou arbustos, e aderem-se imediatamente aos animais e aos indivíduos que passam encostando-se a essa vegetação (Rey, 2008). Além disso, é uma das espécies que mais frequentemente infestam humanos e grandes populações estão sempre presentes em áreas endêmicas para RMSF (Greca et al., 2008; Sangioni et al., 2005). Assim como a maioria dos carrapatos ixodídeos, *A. cajennense* é um carrapato trioxeno, ou seja, com exceção dos ovos, os demais estádios (larval, de ninfa e adulto) precisam encontrar um hospedeiro e alimentar-se de sangue, descendo ao solo após cada repasto sanguíneo. No solo, realizam a ecdise para o estágio seguinte, dando sequência ao ciclo de vida, que dura ao todo cerca de seis meses (**Figura 1**) (Sanavria, Prata, 1996).

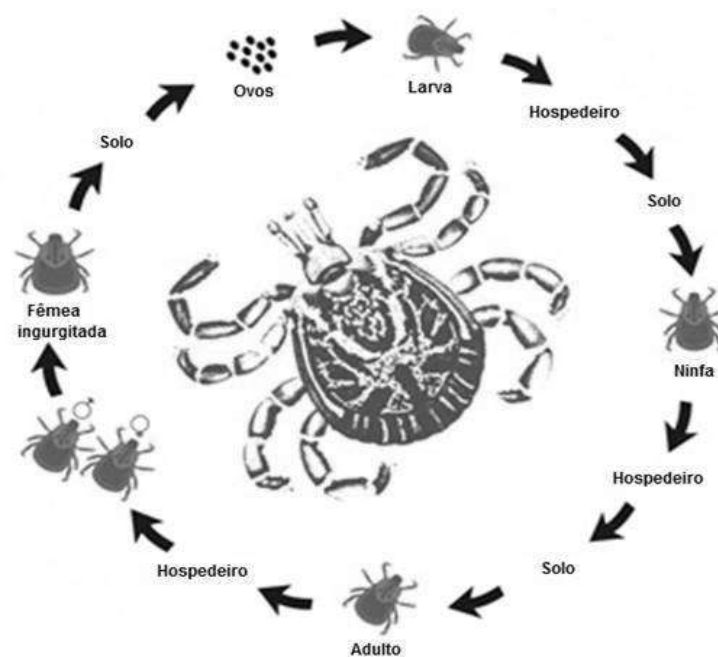


Figura 1. Ciclo de vida de *Amblyomma cajennense*. As larvas eclodem no solo e buscam seu primeiro hospedeiro. Após repasto sanguíneo, as larvas ingurgitadas caem ao solo onde ocorre a ecdise para o estágio de ninfa. Ao encontrarem um novo hospedeiro, as ninfas realizam repasto sanguíneo e caem novamente 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 Aragão e Fonseca, 1961.

De um modo geral, as larvas e as ninfas de *A. cajennense* apresentam menor especificidade parasitária, podendo alimentar-se do sangue de uma grande diversidade de animais (aves e mamíferos) domésticos ou selvagens. Na fase

adulta, os principais hospedeiros são grandes mamíferos como equinos, antas e capivaras (Greca et al., 2008; Horta et al., 2009; Labruna, 2009; Perez et al., 2008). É importante salientar que *R. rickettsii* circula entre os hospedeiros e os carrapatos independentemente da atuação do homem (Greca et al., 2008). Assim, o homem atua como hospedeiro acidental neste ciclo, podendo ser atacado por todos os estádios parasitários do *A. cajennense*, geralmente por centenas de larvas, dezenas de ninfas, e/ou alguns adultos (Labruna, 2009).

1.4 *R. rickettsii* e hospedeiros amplificadores

No Brasil, capivaras, gambás e cães domésticos são apontados como potenciais hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* (Labruna, 2009). Uma vez infectados, esses animais mantêm a bactéria em níveis altos em sua corrente sanguínea por alguns dias ou semanas, garantindo que mais carrapatos sejam infectados (Burgdorfer et al., 1988). Além disso, a alimentação sanguínea possibilita uma elevação da densidade populacional dos carrapatos, uma vez que as fêmeas direcionam os nutrientes do sangue para a produção de ovos.

A reemergência dos casos de FMB no estado de São Paulo foi associada ao crescente número de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). Já foi demonstrado que as capivaras são os hospedeiros preferenciais de *A. cajennense* em áreas endêmicas para a FMB, enquanto em áreas não endêmicas, as populações de carrapatos são sustentadas por cavalos (Labruna et al., 2009). Além disso, foi comprovado que as capivaras são os principais reservatórios amplificadores de *R. rickettsii* para *A. cajennense* (Souza et al., 2009).

Apesar da participação de hospedeiros amplificadores, as taxas de prevalência de *R. rickettsii* nas populações naturais de carrapatos vetores são baixas, em geral em torno de 1% (Burgdorfer et al., 1988; Guedes et al., 2005; Pinter, Labruna, 2006; Sangioni et al., 2005). Por exemplo, na costa leste dos Estados Unidos, onde o carrapato *D. variabilis* é o vetor da bactéria, a prevalência de carrapatos infectados nas zonas endêmicas varia entre 0,05 e 1,3% (Burgdorfer et al., 1988). No Brasil, há relatos de 1,28% de prevalência em uma população de *A. cajennense* em Juiz de Fora, Minas Gerais (Guedes et al., 2005) e de 0,89% em

uma população de *A. aureolatum* em Mogi das Cruzes, São Paulo (Pinter, Labruna, 2006).

Além disso, a FMB apresenta uma distribuição irregular ao longo do tempo mesmo nas zonas endêmicas, havendo períodos de anos consecutivos com relatos de casos da doença alternados por períodos de ausência de casos. É provável que esse padrão irregular de distribuição da doença seja decorrente do desaparecimento da bactéria da população do vetor em determinados períodos, o que é atestado pela ausência de animais sentinelas como, por exemplo, capivaras e cães soro-reativos para a bactéria (Cardoso et al., 2006).

1.5 *R. rickettsii* e carrapatos vetores

Apesar de infectar apenas células endoteliais do hospedeiro vertebrado, *R. rickettsii* é capaz de infectar praticamente todos os tecidos dos seus carrapatos vetores, inclusive os ovários, transferindo bactérias para a geração subsequente através dos ovos (transmissão transovariana). Além disso, depois da primeira infecção, ocorre a transferência de bactérias de um estágio para o outro e o carrapato permanece infectado por toda a vida (transmissão transestadial). No entanto, caso não ocorra reinfecção, a bactéria tende a desaparecer após algumas gerações (Greca et al., 2008; Labruna, 2009; Macaluso et al., 2001; Parola et al., 2005). Além das transmissões transovariana e transestadial, *R. rickettsii* pode ainda ser transmitida horizontalmente durante a co-alimentação de indivíduos infectados e não infectados sobre o mesmo hospedeiro (transmissão interstadial) (Azad, Beard, 1998). Também há indícios de que a transmissão de um macho infectado para uma fêmea não infectada ocorra graças à presença da bactéria nas espermátides, caracterizando uma transmissão sexual (Hayes et al., 1980). Como os carrapatos são capazes de manter-se infectados durante gerações, também atuam como reservatórios da bactéria, além de vetores (Burgdorfer et al., 1988; Labruna, 2009).

Apesar dos diferentes meios de transmissão e da participação de hospedeiros amplificadores, baixas taxas de prevalência de *R. rickettsii* nas populações de carrapatos são observadas, como mencionado anteriormente. A baixa prevalência de carrapatos infectados, mesmo em regiões endêmicas, parece estar associada a menores taxas reprodutivas e de sobrevivência de linhagens infectadas, havendo

evidências laboratoriais de que *R. rickettsii* seja patogênica para seus vetores (Burgdorfer et al., 1988; Labruna et al., 2008; Niebylski et al., 1999; Soares et al., 2012).

Interessantemente, colônias de *A. cajennense* e *A. aureolatum* mantidas em laboratório apresentam diferenças quanto à susceptibilidade à *R. rickettsii* (Labruna et al., 2008). Em infecções experimentais, 80-100% dos indivíduos de uma colônia de *A. aureolatum* mostraram-se susceptíveis à infecção, enquanto apenas 10-60% dos indivíduos de uma colônia de *A. cajennense* se infectaram (Labruna et al., 2008). Estes dados sugerem que as respostas dessas duas espécies de carrapatos à infecção sejam diferentes, resultando em diferentes taxas de prevalência da bactéria. Dessa maneira, a caracterização molecular das interações entre os carrapatos vetores e a bactéria *R. rickettsii* torna-se importante, podendo gerar informações tanto para o esclarecimento dos mecanismos de patogenicidade de *R. rickettsii* para carrapatos, quanto para um melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pela aparente restringência de *A. cajennense* à infecção.

1.6 A aquisição e a transmissão de riquetsias por carrapatos

Após a aquisição inicial de alimento e chegada da refeição sanguínea contendo riquetsias no lúmen do intestino do carrapato vetor, estas invadem as células epiteliais, onde sofrem um primeiro ciclo de replicação. Assim, o intestino corresponde à primeira barreira encontrada para a aquisição do patógeno (Nuttall, Labuda, 2004). Esse processo é seguido pela invasão da cavidade corporal (hemocele), atingindo todos os tecidos através da hemolinfa. Posteriormente, ocorre a invasão e colonização das glândulas salivares, onde uma segunda etapa de replicação tem início, seguida pela transmissão do patógeno através da saliva durante a alimentação sanguínea subsequente (**Figura 2**) (Futse et al., 2003; Löhr et al., 2002; Parola et al., 2005; Santos et al., 2002;).

O intestino dos carrapatos é, provavelmente, o órgão mais importante para a sobrevivência e proliferação dos patógenos, uma vez que muitos deles necessitam persistir no mesmo até a muda e/ou a subsequente alimentação (Hajdušek et al., 2013; Sonenshine et al., 2005). Como realizam digestão intracelular, os patógenos não sofrem o ataque de enzimas digestivas no intestino dos carrapatos. Porém, já foi

demonstrada a presença de peptídeos antimicrobianos (PAM) resultantes da digestão da hemoglobina do hospedeiro no intestino (Belmonte et al., 2012; Fogaça et al., 1999; Nakajima et al., 2002; Sonenshine et al., 2005). Além dos fragmentos de hemoglobina, PAM como defensinas e lisozimas também foram identificados nos intestinos de algumas espécies de carrapatos (Anderson, Magnarelli, 2008; Kopáček et al., 1999; Nakajima et al., 2002; Sonenshine et al., 2002). Os dados genômicos e transcriptômicos de algumas espécies também apontam a presença de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo, as quais podem estar envolvidas no controle de patógenos (Hajdušek et al., 2013). Em conjunto, esses trabalhos sugerem que o intestino do carrapato seja um ambiente hostil para microrganismos invasores.

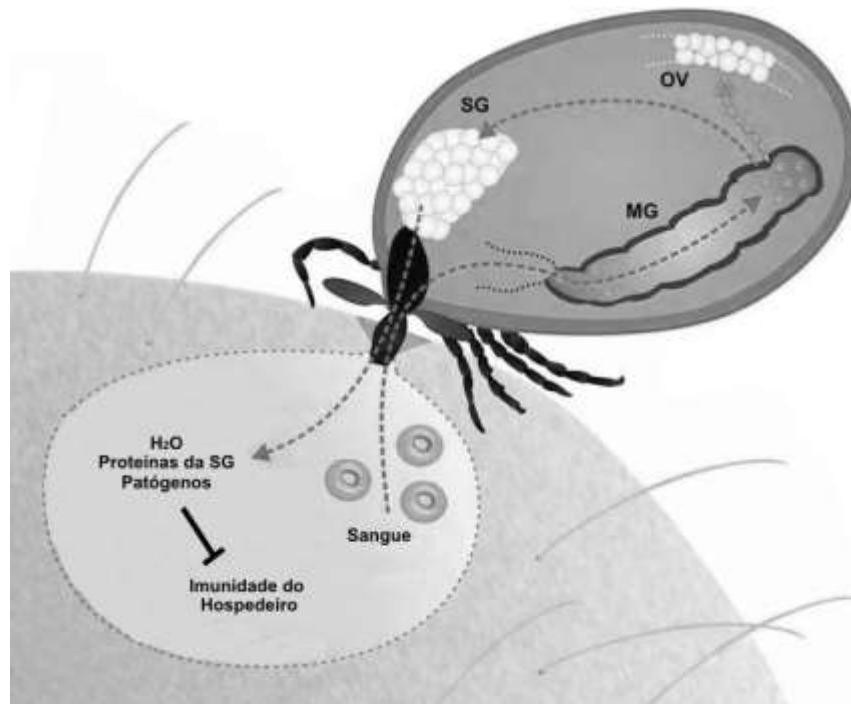


Figura 2. Interações entre patógenos, carrapatos e o hospedeiro vertebrado. A aquisição de patógenos por carrapatos e sua transmissão para o hospedeiro vertebrado estão intimamente ligadas aos aspectos fisiológicos da alimentação sanguínea e da imunidade inata do carrapato. O sangue do hospedeiro contendo patógenos é ingerido e chega ao intestino (MG) do carrapato. Enquanto a hemoglobina e outras proteínas são absorvidas pelas células intestinais e digeridas intracelularmente nas vesículas digestivas (Sojka et al., 2013), os patógenos precisam evadir ao ataque de respostas imunes deflagradas pela infecção nesse tecido, colonizando-o. Via hemocele, os patógenos chegam aos tecidos periféricos. Porém, na hemocele, também precisam evadir ao ataque de respostas do sistema imune inato. Alguns patógenos conseguem alcançar aos ovários (OV) e colonizá-lo, podendo ocorrer transmissão transovariana. O patógeno também atinge as glândulas salivares (SG) e a saliva. Nesse órgão, o excedente de água (H₂O) do sangue adquirido é captado e devolvido ao hospedeiro juntamente com a saliva, contendo o patógeno. A saliva contém ainda uma grande variedade de moléculas com função anticoagulante, imunomoduladora e anti-inflamatória, as quais têm como função auxiliar o processo de alimentação dos carrapatos, mas que, em decorrência de suas propriedades, podem propiciar a aquisição e a transmissão de patógenos.

Fonte: adaptado de Hajdušek et al., 2013

Em carrapatos, assim como em insetos e outros artrópodes, a hemocele é preenchida por um fluido, conhecido como hemolinfa, que banha todos os órgãos. A hemolinfa consiste em plasma (líquido rico em proteínas) e hemócitos (células circulantes) e ambos desempenham um papel importante na defesa imune do artrópode (Sonenshine, 1991; Sonenshine, Hynes, 2008). Diversos estudos demonstraram a capacidade dos hemócitos de fagocitar materiais exógenos e microrganismos (Buresová et al., 2006; Inoue et al., 2001; Loosová et al., 2001; Pereira et al., 2001). Além disso, demonstrou-se que a fagocitose está associada com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Pereira et al., 2001). Moléculas do sistema complemento-*like* (Buresova et al., 2011, 2009) e PAM (Ceraul et al., 2003; Fogaça et al., 2004, 2006) também já foram identificados na hemolinfa (Gudderra et al., 2002; Kopáček et al., 2010; Sonenshine, Hynes, 2008).

As glândulas salivares, por sua vez, possuem um papel fundamental durante o repasto sanguíneo dos carrapatos, auxiliando no balanço hídrico e secretando uma grande variedade de moléculas farmacologicamente ativas na saliva, as quais auxiliam a aquisição de sangue. Como essas moléculas inibem a hemostasia e as respostas imunológicas do hospedeiro, podem facilitar a transmissão de patógenos (Nuttall, 2009; Valenzuela, 2004). Dessa forma, cada um desses órgãos e/ou compartimentos pode desempenhar um papel decisivo na competência vetorial do carrapato para um determinado patógeno (Hajdušek et al., 2013; Ueti et al., 2007).

1.7 Análises transcricionais

Durante a infecção, os patógenos promovem a modulação (indução ou repressão) da expressão de genes de seus hospedeiros e vetores. Essa modulação gênica pode tanto levar ao controle do patógeno como pode favorecer o mesmo, que manipula a maquinaria da célula hospedeira em benefício próprio. Dessa maneira, conhecer os genes que são expressos diferencialmente, assim como determinar os seus níveis de expressão, pode auxiliar a identificação das funções envolvidas nos processos de defesa ou de colonização do vetor ou ainda da transmissão do patógeno para o hospedeiro vertebrado (Carpi et al., 2011; Valenzuela, 2004).

Existem diversas metodologias para a identificação da expressão diferencial de genes, como por exemplo: a análise de bibliotecas de ESTs (*Expressed*

Sequence Tags) (Boguski et al., 1994), Análise Serial da Expressão Gênica (*Serial Analysis of Gene Expression – SAGE*) (Velculescu et al., 1995), microarranjos (*microarrays*) de cDNA ou de oligonucleotídeos (Kreil et al., 2006), Hibridação Subtrativa por Supressão (*Suppressive Subtractive Hybridization - SSH*) (Diatchenko et al., 1996) e, mais recentemente, o sequenciamento de última geração (RNAseq) (Mutz et al., 2013). A utilização dessas técnicas tem contribuído para a análise global dos transcritos, o entendimento da expressão diferencial e a caracterização da transcrição em células ou tecido específicos frente a diferentes condições (Wang et al., 2009).

A metodologia de SSH ainda é uma técnica muito utilizada, sendo baseada em reações em cadeia da polimerase (PCR) que combina normalização e subtração em um único procedimento. Enquanto a etapa de normalização equaliza a abundância de cDNA dentro da população alvo, o passo de subtração exclui as sequências comuns entre as duas populações (condição controle *versus* condição teste). Em um sistema modelo, essa técnica permitiu o enriquecimento de sequências raras em mais de 1000 vezes e com apenas uma rodada de hibridização subtrativa (Diatchenko et al., 1996).

Alguns trabalhos foram previamente realizados para determinar os efeitos da infecção por bactérias do gênero *Rickettsia* sobre o perfil de expressão gênica de carrapatos (Ceraul et al., 2007; Macaluso et al., 2003, 2006; Mulenga et al., 2003). Utilizando o método de hibridação subtrativa por supressão (SSH), genes diferencialmente expressos em *D. variabilis* infectados com *R. montanensis* foram identificados (Mulenga et al., 2003). Onze genes diferencialmente expressos codificavam proteínas com similaridade com proteínas associadas à resposta imune do carrapato, à adesão ou recepção de moléculas e à resposta ao estresse. O gene codificador da glutathione S-transferase (GST), que é relacionado ao estresse oxidativo, está entre os genes com expressão induzida pela infecção. A indução do gene codificador dessa enzima também foi observada após a alimentação sanguínea de carrapatos (Dreher-Lesnack et al., 2006), sugerindo uma correlação entre a alimentação e a resposta contra a infecção. Ceraul e colaboradores (2007) descreveram a modulação da expressão gênica do PAM defensina em diferentes tecidos do carrapato *D. variabilis* infectado também com *R. montanensis*. Nesta mesma espécie de carrapato, um inibidor de serina-proteases Kunitz-type também

foi estudado, mostrando que este peptídeo apresenta uma atividade bacteriostática contra *R. montanensis* (Ceraul et al., 2008). No entanto, os resultados desses estudos são de difícil transposição para os efeitos da *R. rickettsii* sobre seus vetores, já que a *R. montanensis* não é patogênica para os carrapatos, tampouco para humanos e outros animais (Macaluso et al., 2002).

1.8 Análises funcionais

Uma vez determinados os efeitos da infecção sobre o perfil de expressão gênica do carrapato vetor, a elucidação da função desses genes nos processos de colonização pela bactéria ou transmissão para o hospedeiro vertebrado é fundamental (Mello, Conte, 2004). Dentre os métodos disponíveis, o RNA de interferência (RNAi) é um dos mais utilizados, inclusive em carrapatos (Aljamali et al., 2002; de la Fuente et al., 2005, 2007a, b; Kocan et al., 2008, 2009, 2011; Nijhof et al., 2007). A utilização da técnica de RNAi *in vivo* permite elucidar mecanismos fisiológicos de genes específicos e propiciam a descoberta rápida de alvos para vacinas contra carrapatos. Esta estratégia pode fornecer ainda *insights* sobre o significado evolutivo e biológico de pontos que são cruciais para a invasão e colonização do vetor pelo patógeno e sua transmissão para o hospedeiro vertebrado (Aung et al., 2011).

Em *Rhipicephalus haemaphysaloides*, a rhipilin-1, uma proteína de glândula salivar com atividade anticoagulante e um domínio Kunitz-*type*, foi silenciada. Como efeito, foi observado o prolongamento do tempo necessário para a fixação à pele do hospedeiro e a taxa de ingurgitamento diminuiu significativamente (Gao et al., 2011). Apesar de alterar a aderência e o ingurgitamento dos carrapatos, a alimentação sanguínea não foi comprometida, possivelmente em decorrência da presença de outras proteínas na saliva que suprem a sua ausência. Também foi demonstrado que o silenciamento de um inibidor Kunitz-*type* ocasiona um aumento da infecção por *R. montanensis* no intestino do carrapato *D. variabilis* (Ceraul et al., 2011). Já o silenciamento do PAM varisina (uma defensina) provocou uma redução da infecção com *A. marginale* em *D. variabilis*, ao contrário do esperado (Kocan et al., 2008). Similarmente, o silenciamento da ferritina em uma linhagem de células de carrapatos *I. scapularis* (IDE8) mantida em cultura também diminuiu a infecção, indicando que

estas proteínas sejam importantes para a invasão e estabelecimento de *A. marginale* em carrapatos (de la Fuente et al., 2007a).

Também foi relatado que o silenciamento da GST, da V-ATPase, da selenoproteína M e da subolesina apresentou efeitos nas colônias de *A. marginale*, promovendo mudança no padrão das formas densas e reticuladas das colônias, podendo afetar sua multiplicação no intestino e/ou glândulas salivares do carrapato *D. variabilis* (Kocan et al., 2009). Recentemente, a subolesina foi apontada como um novo candidato a antígeno protetor contra carrapatos (Almazán et al., 2003; de la Fuente et al., 2011). Ensaio de vacinação com subolesina recombinante e seu ortólogo em insetos, a akirina, demonstrou-se efetiva no controle das infestações por artrópodes vetores de diversas espécies de carrapatos argasídeos e ixodídeos, assim como em mosquitos, flebotomíneos, ácaros e piolhos. Os efeitos causados por essa vacinação foi a redução do número de indivíduos da população, do peso, da massa de ovos postos, da fertilidade e/ou da muda. Além disso, o silenciamento também reduziu a infecção de carrapatos da espécie *Ixodes scapularis* por patógenos, como *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Borrelia burgdorferi* (de la Fuente et al., 2013).

2 OBJETIVOS

Com base nos dados da literatura acima apresentados, o objetivo geral desta dissertação foi avaliar os efeitos da infecção por *Rickettsia rickettsii* sobre o perfil de expressão gênica do carrapato *Amblyomma cajennense* e caracterizar funcionalmente os genes modulados por esta infecção. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Determinar os efeitos da infecção por *R. rickettsii* sobre o perfil de expressão gênica de carrapatos *A. cajennense* por hibridação subtrativa por supressão (SSH);
2. Validar os dados de modulação da expressão gênica obtida por SSH utilizando reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa (RT-qPCR);
3. Silenciar a expressão de dois genes induzidos pela técnica de RNAi e avaliar os efeitos do silenciamento sobre a aquisição de *R. rickettsii*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Rickettsia rickettsii*

A cepa Taiacu de *R. rickettsii*, que foi utilizada neste trabalho, é proveniente de um espécime de carrapato *A. aureolatum* coletado no município de Mogi das Cruzes, São Paulo. As bactérias foram amplificadas pela inoculação do homogeneizado desse espécime de carrapato em cobaias (*Cavia porcellus*), as quais foram sacrificadas durante o pico febril da infecção, sendo seus órgãos armazenados a -80 °C para posteriores infecções experimentais (Pinter e Labruna, 2006).

3.2 *Amblyomma cajennense*

A colônia de carrapatos *A. cajennense*, proveniente da região de Pirassununga-SP, foi mantida nas dependências do laboratório do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna (Departamento de Saúde Preventiva, FMVZ-USP). Durante as fases de vida parasitária, os carrapatos (estádios larval, de ninfa e adulto) foram alimentados em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Durante as fases não parasitárias, os carrapatos foram mantidos em incubadoras BOD com temperatura de 25 °C e umidade relativa de 85% (Pinter et al., 2002).

3.3 Infecção experimental de carrapatos

Para a obtenção de carrapatos infectados por *R. rickettsii*, coelhos foram inoculados intraperitonealmente com um homogeneizado de fígado e baço de uma cobaia previamente sacrificada durante o pico febril da infecção com a cepa Taiacu (seção 3.1). A temperatura dos coelhos foi aferida diariamente e, no primeiro dia do pico febril, as larvas foram depositadas em câmaras de algodão previamente afixadas no dorso tricotomizado destes animais. Coelhos que não receberam o inóculo foram utilizados como hospedeiros para a alimentação de carrapatos não infectados (controle). As larvas ingurgitadas, desprendidas naturalmente do hospedeiro, foram transferidas para incubadoras BOD (seção 3.2) para que

realizassem a ecdise para o estágio de ninfa. Após 40 dias, as ninfas de *A. cajennense* foram alimentadas em coelhos infectados ou não infectados (controle) até o seu completo ingurgitamento e desprendimento natural do hospedeiro. Após a queda, as ninfas foram transferidas para incubadoras BOD para a ecdise para o estágio adulto, onde permaneceram por 60 dias. Os adultos também foram alimentados em coelhos infectados ou não infectados, mas foram retirados manualmente da pele do hospedeiro após 3 dias.

Os coelhos foram monitorados clinicamente para a infecção por *R. rickettsii* durante todo o período de alimentação dos carrapatos. Para tal, a temperatura retal dos animais foi aferida diariamente. Além disso, a avaliação sorológica foi realizada nos sobreviventes 21 dias após a infestação com os carrapatos infectados para a averiguação de soro-conversão (Labruna et al., 2007). A avaliação sorológica também foi realizada nos coelhos infestados com carrapatos não infectados para atestar que as mesmas apresentavam-se livres de infecção. Os procedimentos para a experimentação com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.4 Dissecção de glândulas salivares e intestinos

Os carrapatos adultos foram lavados em etanol 70% e tampão salino fosfato PBS (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 7,4) estéril para a desinfecção da cutícula. Em seguida, foram transferidos individualmente para uma base de parafina e imersos em PBS estéril. Com a região dorsal voltada para cima, quatro cortes na cutícula (nas regiões anterior, posterior e nas duas laterais) foram cuidadosamente realizadas com o auxílio de uma lâmina de bisturi sob lupa estereoscópica binocular (Leica, Alemanha; modelo EZ-4). Utilizando uma pinça, foi possível remover a carapaça dorsal e separar as glândulas salivares e o intestino. Os órgãos foram lavados em PBS estéril, transferidos individualmente para tubos de polipropileno contendo 50 µL de RNA_{later} (Life Technologies, EUA) e armazenados a -20 °C até a utilização para a extração de ácidos nucleicos.

3.5 Extração de ácidos nucleicos

Os intestinos e as glândulas salivares foram homogeneizados em RNA^{later} com o auxílio de um pistilo. Os homogeneizados foram individualmente submetidos ao isolamento simultâneo de DNA genômico (DNAg) e de RNA total utilizando-se o *InviTrap[®] Spin Cell RNA Mini Kit* (STRATEC Molecular GmbH, Alemanha) e/ou o *Kit NucleoSpin[®] TriPrep* (Macherey-Nagel, EUA), conforme as especificações dos fabricantes. Ao final do procedimento, as concentrações de DNAg e de RNA de cada amostra foram determinadas em um espectrofotômetro (Thermo Scientific, EUA; modelo NanoDrop-1000). As amostras de DNAg e de RNA foram armazenadas a -20 °C e a -80 °C, respectivamente, até a sua utilização nos experimentos.

3.6 Determinação dos níveis de infecção por *R. rickettsii* por PCR quantitativa (qPCR)

O número de bactérias nas glândulas salivares ou intestino foi determinado através de reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) com sonda TaqMan específica para um fragmento de 147 pb do gene de cópia única *gltA* (codificador da citrato sintase) de *Rickettsia* spp. (Galletti et al., 2013; Labruna et al., 2004). Para cada reação, foram utilizados 2 µL de amostra (DNAg), 7,7 µL de *Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Scientific), 8 pmols dos oligonucleotídeos CS-5 (5'-GAG AGA AAA TTA TAT CCA AAT GTT GAT-3') e CS-6 (5'- AGG GTC TTC GTG CAT TTC TT-3'), e 0,5 pmol da sonda interna fluorogênica CS-5-6 (5' - 56 FAM - CAT TGT GCC ATC CAG CCT ACG GT - BHQ 1 - 3'), sendo o volume de 16 µL completado com água livre de nucleases. Em um termociclador StepOnePlus™ e com o auxílio do software StepOne v2.3 (Life Technologies), realizou-se um programa com 10 min iniciais a 95 °C seguidos de 45 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 55 °C e 30 s a 72 °C. O número de cópias de *R. rickettsii* por intestino ou par de glândulas salivares foi determinado de acordo com uma curva padrão obtida pela amplificação de diferentes diluições de um fragmento do gene *gltA* de *R. rickettsii* ($1,4 \times 10^7$ a $1,4 \times 10^2$ cópias) ligado a um plasmídeo. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O DNA genômico extraído das amostras não infectadas também foram analisados para que a ausência de infecção fosse confirmada.

3.7 Construção de bibliotecas subtrativas de cDNA

O RNA total das glândulas salivares de nove fêmeas adultas, apresentando entre 1×10^4 e 3×10^4 células de *R. rickettsii* por glândula salivar, foi reunido para a obtenção de uma amostra *pool* infectada, denominada Acl. O RNA total de oito fêmeas adultas não infectadas também foi reunido para constituir a amostra *pool* controle, nomeada AcC. As amostras foram encaminhadas para uma *facility* especializada (Evrogen JCS - Moscou, Rússia) para a construção das bibliotecas de cDNA através procedimento sumarizado a seguir.

3.7.1 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 µg de RNA total como molde. Um µL da amostra de cDNA diluída 5x (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*.

3.7.2 Hibridação subtrativa por supressão

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

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

Adaptador 1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGCAGGT-3' 3'-GGCCCGTCCA-5'
Adaptador 2R	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-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 AcC e Acl específicas.

3.7.3 Construção das bibliotecas AcC e Acl-específicas

Após a purificação do cDNA das amostras obtidas pela *Nested PCR* descrita na seção anterior, 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*.

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

3.7.4.1 Varredura diferencial

Dentre as colônias de *E. coli* que não apresentaram a expressão da β -galactosidase (de coloração branca), noventa e seis clones das bibliotecas AcC-específica e 480 clones das bibliotecas Acl-específica 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* (utilizando-se a mesma disposição dos clones nas placas de 96 poços) e hibridados com sondas Acl e AcC-específicas marcadas radioativamente com P-32. As sondas específicas foram

produzidas submetendo-se as amostras resultantes da PCR primária, descrita na seção 3.7.2, a uma *Nested PCR* com os oligonucleotídeos curtos *Nested Primer 1S* (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.

Ao restante da cultura bacteriana adicionou-se glicerol (concentração final de 20%) e as placas foram armazenadas a -70 °C.

3.7.4.2 Northern Blot virtual

Os cDNAs AcC e Acl não subtraídos, obtidos conforme descrito na seção 3.7.1, foram separados por eletroforese em gel de agarose e transferidos para membranas *Hybond-N*. As membranas foram hibridadas com sondas específicas marcadas com P-32, preparadas a partir de clones diferencialmente expressos identificados pela varredura diferencial e selecionados aleatoriamente.

3.8 Sequenciamento

Preparações dos plasmídeos de todos os clones identificados como específicos das bibliotecas AcC e Acl foram submetidos ao sequenciamento pela contratação dos serviços da Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão (FUNEP) da UNESP (Jaboticabal-SP). As duas fitas complementares dos plasmídeos foram amplificadas com 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* (Applied Biosystems, EUA). O sequenciamento foi realizado em um equipamento ABI 3100 (Applied Biosystems).

3.9 Anotação das bibliotecas subtraídas de cDNA

Os cromatogramas obtidos pelo sequenciamento foram submetidos ao *pipeline* de processamento de pré-anotação no sistema EGene (Durham et al., 2005). Este *pipeline* consistiu na avaliação da qualidade, no mascaramento dos

oligonucleotídeos e do vetor, na filtração de leituras de baixa qualidade, no apuramento 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, de cães e humanas). Em seguida, as sequências processadas e aceitas pelo *pipeline* foram montadas pela utilização do programa CAP3 (Huang, Madan, 1999) (versão 12/21/07) com parâmetros *default*.

As sequências montadas foram, então, submetidas a um *pipeline* de anotação automática no sistema EGene2 (versão em desenvolvimento por Alan M. Durham 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 (Käll et al., 2004) e na busca de peptídeo sinal com os programas SignalP (Bendtsen et al., 2004). 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.

3.10 Desenho e síntese de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos específicos para cada gene selecionado para a validação dos dados de SSH (**Tabela 2**) por RT-qPCR ou para o silenciamento gênico por RNAi (**Tabela 3**) foram desenhados utilizando-se o programa Primer 3 (Rozen, Skaletsky, 2000), analisados pelo Gene Runner versão 3.05 e sintetizados pela Life Technologies.

Tabela 2. Oligonucleotídeos específicos para os genes de *A. cajennense* selecionados para a validação por RT-qPCR.

Gene	Oligonucleotídeos
Subunidade I da citocromo <i>c</i> oxidase (COX1) (Ac_03)	5'- CTG ACA TAG CAT TTC CCC GT -3' 5'- CCA GCC CCT GAC TCA ATA AG -3'
Proteína com domínio Kunitz- <i>type</i> (papilina- <i>like</i>) (Ac_06)	5'- TGC ATT CGG TTT CGG TAA A -3' 5'- TTT CAT AGC CGG CAC TCT GT -3'
Subunidade 4 da NADH desidrogenase (Ac_08)	5'- CAT CTT TGA CTT CCA AAA GC -3' 5'- CGG AAA ATT CCA TAA ACT CC -3'
Subunidade I da citocromo <i>c</i> oxidase (COX1) (Ac_01)	5'- CAT AGG GAG GGA GGC AAA AG -3' 5'- GGA TTC GGC AAT TGA CTT GT -3'
Proteína ligante de histamina (Ac_07)	5'- ACG CAG GTA TGT CCC TGG AG -3' 5'- CTG AAA AAC CTT CGC TGG AC -3'
Inibidor de protease Kunitz- <i>type</i> (Ac_13)	5'- TCT TTG GTT TTG ACC CTT CG -3' 5'- CGG TAG TGC CCA GTA AGG AG -3'
Hebraeína*	5'- GTA AGG CAC TCA CTC AAC GA -3' 5'- GCT CCA AGT GAT GTG CTG AA -3'
Ferritina*	5'- CAA GCT GGC TAC TGA CCA -3' 5'- GTC CGA GAG CTC CTT GAT TG -3'
Glutathion S-transferase*	5'- TGG CAT GTA TTT GGT GGA GA -3' 5'- GGA CTC GAA GAA CAG CAT CC -3'
α -macroglobulina*	5'- CTT CGT GTC GCT GAG ATC AA -3' 5'- GAA GGG TAC GTG GGG TAG GT -3'
Kunitz ACAJ0015C*	5'- TCT TGC TGA CCC TTT TCA CA -3' 5'- TTT CGT TTC CTT CAC AAC CA -3'
Kunitz ACAJ1187S*	5'- ACG AAA CAT GCA GCA ACA AA -3' 5'- TTC GGT GAC TCG AAG TGA AA -3'
Kunitz ACAJ1219S*	5'- CCA TGC TGG ATT TTT GGA CT -3' 5'- GCC GCG TCG AAG TAG TAG AG -3'

*Genes selecionados com base em dados da literatura (Batista et al., 2008).

Tabela 3. Oligonucleotídeos específicos dos genes de *A. cajennense* selecionados para o silenciamento por RNAi e para a avaliação do silenciamento por RT-qPCR.

Gene	Oligonucleotídeos
Teste_Hebraeína_Aa	5'- TCA GTG ACC ACT CAC CAT GAA -3' 5'- CGG TCT TCT TGC ATA GCT CCA G -3'
dsRNA_Hebraeína_Ac*	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT CTT CGC CTG CTG TCT GCT -3' 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCT GTT GCA AAT TGC CAG AGA -3'
Teste_Kunitz_Ac06	5'- CGT GGC CTG ATC TTC GTG AT -3' 5'- GCC GTT GGT ATT CTC CAC CTG -3'
dsRNA_Kunitz_Ac06*	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCT TTG CTG GCG CTT TTG GCT -3' 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCG ATG AGG GAA CCT GTG ATG CT -3'

*Oligonucleotídeos acoplados à cauda T7 (sublinhada) utilizado para síntese de dsRNA (seção 3.15.1).

3.11 Síntese de cDNA

Para a determinação das curvas de eficiência dos oligonucleotídeos, 500 ng de RNA total foram submetidos ao tratamento com DNase RQ1 (Promega, EUA) para a remoção de resíduos de DNAg. O RNA resultante foi utilizado como molde para a transcrição reversa em cDNA. Para tal, 10 pmols do oligo dT *Anchor* e 1 μ L

de uma mistura de dNTP (concentração final de 0,4 mM) foram adicionados ao RNA e a mistura foi incubada por 5 min a 65 °C. Após resfriamento em banho de gelo por 1 min, adicionou-se 4 µL do tampão para a enzima M-MLV RT (Life Technologies) concentrado 5x, 2 µL de DTT (concentração final de 0,1 M). Após incubação a 37 °C por 2 min, foi adicionado 1 µL de M-MLV RT (200 U/µL). A reação foi incubada a 37 °C por 50 min e inativada por 15 min a 70 °C. A concentração de cDNA nas amostras resultantes foi determinada em um espectrofotômetro (Thermo Scientific; modelo NanoDrop-1000), sendo as amostras armazenadas a -20 °C até a sua utilização nas reações.

3.12 Teste dos oligonucleotídeos por PCR convencional

As preparações de oligonucleotídeos (**Tabela 2**) foram testadas, primeiramente, por uma PCR convencional. Para cada reação, adicionou-se 8 µL de *QuantiMix Easy SYBR kit* (Biotools, Espanha), 1 µL de cada oligonucleotídeo específico (10 µM) e 200 ng de cDNA, completando o volume de 16 µL com H₂O ultrapura estéril. Como controle negativo, as reações foram realizadas na ausência de cDNA. O programa térmico utilizado foi de 2 min a 94 °C seguidos de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e 1 min a 72 °C, o qual foi realizado por um termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Alemanha).

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE (TRIS-base 0,09 M, ácido bórico 0,09 M, EDTA 2 mM). As amostras foram adicionadas de 1/10 do volume com solução contendo glicerol 50%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilenocianol 0,25% (p/v) e aplicadas no gel. Após eletroforese com voltagem constante de 100 V por 60 min, o DNA foi visualizado por tratamento com Gel RED™ (Uniscience, EUA) sob luz ultravioleta (UV) em um transluminador acoplado a um sistema de imagens (GE Healthcare, EUA; modelo ImageQuant™ 300).

3.13 Determinação da eficiência dos oligonucleotídeos por RT-qPCR

Os oligonucleotídeos testados por PCR que apresentaram um único produto de amplificação de tamanho esperado foram selecionados para a determinação da

eficiência por RT-qPCR. Para isso, 8 µL de *Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix* (Thermo Scientific), 1 µL de cada oligonucleotídeo específico (concentração final 0,2 pmol/µL) e 4 µL de água ultrapura foram adicionados a diluições seriadas (na base 2) de cDNA (400 - 3,12 ng). Como controle negativo, as reações foram realizadas na ausência de cDNA. As reações foram realizadas em um termociclador StepOnePlus™ software StepOne v2.3 (Life Technologies) utilizando-se o programa térmico de 10 min a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 60 s a 60 °C e 20 s a 72 °C. A expressão do gene codificador da proteína ribossômica S3A (senso: 5'- TAC CTG CTG CGA ATG TTC TG -3' e antissenso: 5'- TTC TTC CTG ATG AGG CGA AC -3'), normalizador da quantidade de cDNA nas amostras, também foi avaliada. Ao término da reação, o Ct (*Cycle threshold*) para cada diluição foi utilizado para a construção de uma curva para a determinação da eficiência de amplificação.

3.14 Validação dos dados obtidos pela hibridização subtrativa por PCR quantitativa precedida por transcrição reversa (RT-qPCR)

3.14.1 Reação de pré-amplificação

Para a validação dos dados obtidos por SSH, 300 ng do RNA total foram submetidos ao tratamento com DNase e utilizados como molde para a transcrição reversa em cDNA, como descrita anteriormente (seção 3.11). Para a pré-amplificação, 20 µL do *TaqMan® PreAmp Master Mix 2x* (Life Technologies) e 10 µL de uma mistura de oligonucleotídeos (concentração final de 50 nM) foram misturados com 10 µL de cada amostra de cDNA. As amostras foram submetidas a um programa térmico de 10 min a 95 °C, para ativação da enzima, seguidos de 14 ciclos de 15 s a 95 °C e 60 °C por 4 min. Ao final da reação, foi adicionada H₂O ultrapura estéril para completar um volume de 160 µL.

3.14.2 qPCR

Dois µL de cDNA pré-amplificado (seção 3.14.1) foram utilizados como molde nas reações, realizadas no mesmo equipamento e condições utilizados para a

determinação da eficiência dos oligonucleotídeos (seção 3.13). 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 $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme interpretação proposta por (Livak e Schmittgen, 2001).

A expressão diferencial do gene codificador da proteína com domínio Kunitz-*type* foi determinada por quantificação absoluta utilizando uma curva-padrão (diluições seriadas de 10^2 a 10^8 moléculas) de um fragmento desse gene obtido por PCR convencional. O número de cópias desse gene em cada amostra foi determinado com base na curva-padrão. As quantidades de cDNA nas amostras também foi normalizada de acordo com a expressão do gene codificador da proteína ribossômica S3A. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste T de *Student*.

3.15 Silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi)

3.15.1 Síntese de dsRNA

Para a construção de duplas fitas de RNA (dsRNA), os oligonucleotídeos específicos para as sequências codificadoras da hebraeína e da proteína com domínio de inibidor Kunitz-*type* foram sintetizados acoplados a uma cauda T7 (**Tabela 3**). Tais oligos foram utilizados para gerar fragmentos de RNA com tamanho próximo a 400 pb através de PCR convencional e pela utilização do kit *T7 Ribomax Express RNAi System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos das reações de PCR foram purificados utilizando o kit *GeneJet™ PCR Purification* (Thermo Scientific). O gene codificador de uma proteína de superfície de membrana (*major surface protein 1 – MSP1*) de *Plasmodium falciparum* clonado em plasmídeo, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gerhard Wunderlich (Depto. de Parasitologia, ICB-USP), foi utilizado como controle (gene não-relacionado).

3.15.2 Administração das dsRNA aos carrapatos, dissecação e extração de material genético

Após a purificação, as dsRNA foram solubilizadas em PBS (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 7,4) estéril e, em seguida, a concentração foi determinada em espectrofotômetro. 10¹¹ moléculas de dsRNA em 33 nL (ninfas) ou 69 nL (adultos) de PBS foram administradas aos carrapatos com o auxílio de um nanoinjetor Nanoject II (Drummond, EUA). A nanoinjeção foi realizada na articulação entre a coxa e o trocanter do terceiro apêndice dos carrapatos previamente fixados em fitas adesivas com a região ventral voltada para cima. Após 24 h de incubação em BOD, os carrapatos sobreviventes foram alimentados em cobaias ou coelhos infectados por *R. rickettsii*. Carrapatos que receberam a dsRNA para o gene de interesse ou para o gene controle (MSP1) foram co-alimentados no mesmo hospedeiro, utilizando câmaras de alimentação independentes.

Os ácidos nucleicos foram extraídos das ninfas inteiras ou das glândulas salivares e intestinos dos carrapatos adultos conforme procedimento descrito na seção 3.4. O RNA foi utilizado para a avaliação do silenciamento gênico por RT-qPCR (seção 3.15.3) e o DNAg para a detecção de *R. rickettsii* por qPCR TaqMan (seção 3.6).

3.15.3 Avaliação da eficiência do silenciamento gênico por RT-qPCR

O RNA total extraído dos carrapatos foi tratado com RQ1 *RNase-free DNase* (Promega) e utilizado como molde para a síntese de cDNA (seção 3.11). Em seguida, as amostras foram analisadas por RT-qPCR (seção 3.13).

Após a normalização das quantidades de cDNA nas amostras de acordo com a amplificação do gene codificador da proteína ribossômica S3A, o nível de silenciamento da expressão do gene de interesse nos carrapatos foi obtido considerando o nível de expressão do mesmo gene nos carrapatos controle como 100%. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de carrapatos *A. cajennense* adultos infectados com *R. rickettsii*

A análise por qPCR TaqMan para o gene *gltA* de *Rickettsia* utilizando o DNAg extraído das glândulas salivares e dos intestinos mostrou que das 146 fêmeas adultas da colônia exposta à infecção, apenas 14 estavam infectadas por *R. rickettsii* (Tabela 4). Nenhuma fêmea do grupo controle foi positiva para a infecção. Observamos que os carrapatos que apresentavam infecção no intestino também apresentavam as glândulas salivares colonizadas, não havendo carrapatos com infecção apenas do intestino.

Tabela 4. Quantificação da infecção por *R. rickettsii* nas glândulas salivares e intestinos de fêmeas. O número de riquétsias por ng de DNA genômico extraído das glândulas salivares (SG) e intestinos (MG) foi determinado por qPCR, utilizando-se para isso a amplificação do gene de cópia única *gltA*.

Amostra	Número de riquétsias por tecido	
	SG	MG
57	$3,15 \times 10^3$	$5,99 \times 10^3$
105	$3,37 \times 10^3$	$1,61 \times 10^4$
114	$4,87 \times 10^3$	$2,17 \times 10^4$
121	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$
94	$1,27 \times 10^4$	$4,63 \times 10^4$
143	$1,37 \times 10^4$	$1,06 \times 10^4$
142	$1,47 \times 10^4$	$4,38 \times 10^3$
59	$1,89 \times 10^4$	$4,14 \times 10^4$
55	$2,01 \times 10^4$	$6,70 \times 10^4$
128	$2,53 \times 10^4$	$8,20 \times 10^3$
125	$2,89 \times 10^4$	$1,70 \times 10^4$
6	$2,94 \times 10^4$	$4,13 \times 10^2$
19	$4,81 \times 10^4$	$6,57 \times 10^2$
80	$8,71 \times 10^4$	$6,07 \times 10^3$

4.2 Análise dos efeitos da infecção sobre o perfil de expressão gênica nas glândulas salivares de *A. cajennense* por SSH

O RNA total extraído das glândulas salivares de nove fêmeas infectadas apresentando $1,00$ a $3,00 \times 10^4$ riquétsias foi utilizado para formar uma amostra *pool*

do grupo infectado (Acl). Outras oito fêmeas do grupo controle, livre de infecção, foram utilizadas na amostra *pool* do grupo controle (AcC). Ambas as amostras foram utilizadas para a construção de bibliotecas de cDNA pelo método de SSH. Duas bibliotecas foram obtidas, uma representando genes induzidos pela infecção (Acl) e outra representando genes reprimidos pela infecção (AcC). Noventa e seis clones da biblioteca AcC (1 placa de 96 poços) e 480 clones da biblioteca Acl (5 placas de 96 poços) foram selecionados aleatoriamente para a varredura diferencial utilizando-se sondas radioativas AcC e Acl específicas. Após esse procedimento, preparações de plasmídeos de 39 clones da biblioteca AcC e 110 clones da biblioteca Acl, considerados específicos pela varredura diferencial, foram obtidas e submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos.

Os cromatogramas do sequenciamento foram submetidos a uma análise bioinformática em colaboração com o Prof. Dr. Arthur Gruber (Depto. de Parasitologia, ICB-USP). Dos 298 cromatogramas obtidos, 217 leituras foram aceitas. As demais foram descartadas por apresentarem baixa qualidade (61), por serem bacterianas (18) ou por serem ribossômicas (2). Por fim, 44 sequências únicas foram obtidas, das quais 36 representam genes de *A. cajennense* com expressão induzida pela infecção com *R. rickettsii* (**Tabela 5**) e 8 representam genes reprimidos pela infecção (**Tabela 6**). As buscas de similaridade por BLAST (utilizando-se um *E-value cutoff* de E-05) e a busca de domínios conservados revelou que 14 sequências não apresentam *hits* com outras sequências nos bancos de dados públicos. As demais sequências apresentaram similaridade com proteínas mitocondriais, proteínas com domínio de inibidor de serina-proteases Kunitz-*type*, proteínas ligantes de histamina, proteína secretada de 8,9 kDa, proteína de sistema nervoso e proteínas hipotéticas (**Tabelas 5 e 6**).

Conforme mencionado acima, diversos genes codificadores de proteínas mitocondriais foram modulados pela infecção. As sequências Ac_08, Ac_20, Ac_23, Ac_25, Ac_29 e Ac_41, codificadoras da enzima NADH desidrogenase, apresentaram indução de sua expressão gênica nas glândulas salivares de fêmeas de *A. cajennense*. Ainda dentre as sequências representando genes mitocondriais modulados pela infecção, três codificam a subunidade 6 da ATPase F0F1. Duas delas (Ac_11 e Ac_21) estão na lista de genes induzidos pela infecção e uma (Ac_40) na lista de genes reprimidos. Além disso, um grande número de sequências

codificadoras de subunidades da citocromo *c* oxidase foram identificadas tanto na biblioteca representando genes induzidos (Ac_03, Ac_15, Ac_18, Ac_39) quanto na biblioteca representando genes reprimidos (Ac_33, Ac_36, Ac_22, Ac_05, Ac_24) pela infecção. Dois genes codificadores do citocromo *b* também foram identificados, sendo um induzido pela infecção (Ac_09) e outro reprimido (Ac_24).

Tabela 5. Similaridade entre as sequências representando genes de *A. cajennense* com expressão induzida nas glândulas salivares pela infecção por *R. rickettsii* e sequências disponíveis em bancos públicos de dados.

Similaridade	Contig ou Singlet	E-value	Organismo	GenBank
Proteína ligante de histamina	Ac_07	8×10^{-09}	-	PF02098
	Ac_42	0.36	<i>I. scapularis</i>	AAU66644.1
Proteína papilina-like com domínio Kunitz-type	Ac_06	1×10^{-25}	<i>A. americanum</i>	ACG76190.1
Inibidor de protease Kunitz-type	Ac_13	1×10^{-48}	<i>A. americanum</i>	ACG76175.1
Subunidade IV da NADH desidrogenase	Ac_08	2×10^{-142}	<i>A. americanum</i> <i>A. cajennense</i>	DQ168137.1
	Ac_23	2×10^{-68}		AFU55273.1
	Ac_25	5×10^{-81}		AFU55273.1
	Ac_29	7×10^{-10}		AFU55273.1
	Ac_41	4×10^{-37}		AFU55274.1
Subunidade V da NADH desidrogenase	Ac_20	2×10^{-88}	<i>A. variegatum</i>	BK007493.1
Citocromo <i>b</i>	Ac_09	0.0	<i>A. americanum</i>	DQ168129.1
Subunidade I da citocromo <i>c</i> oxidase (COX1)	Ac_03	2×10^{-105}	<i>D. reticulatus</i>	AF132829.1
	Ac_15	0.0	<i>A. americanum</i>	DQ168131.1
Subunidade III da citocromo <i>c</i> oxidase (COX3)	Ac_18	0.0	<i>A. americanum</i>	DQ168133.1
F0F1 ATPase subunidade 6	Ac_11	1×10^{-73}	<i>A. cajennense</i>	YP7475019.1
	Ac_21	3×10^{-35}		AFU55268.1
Proteína da biogênese da citocromo <i>c</i> oxidase	Ac_39	9×10^{-23}	<i>I. scapularis</i>	EEC07245.1
Proteína relacionada ao sistema nervoso	Ac_43	8×10^{-15}	<i>I. scapularis</i>	EEC09109.1
Proteína putativa secretada de 8.9 kDa	Ac_14	2×10^{-10}	<i>R. sanguineus</i>	ACX53877.1
Proteínas hipotéticas	Ac_16	-	<i>A. maculatum</i> <i>H. longicornis</i> <i>A. cajennense</i>	-
	Ac_28			
	Ac_37			
	Ac_38			
No hits	Ac_02	-	-	-
	Ac_04			
	Ac_10			
	Ac_12			
	Ac_17			
	Ac_19			
	Ac_26			
	Ac_27			
	Ac_30			
	Ac_31			
	Ac_34			
	Ac_35			
	Ac_44			

Tabela 6. Similaridade entre as sequências representando genes de *A. cajennense* com expressão reprimida nas glândulas salivares pela infecção por *R. rickettsii* e sequências disponíveis em bancos públicos de dados.

Similaridade	Contig ou Singlet	E-value	Organismo	GenBank
Subunidade I da citocromo c oxidase (COX1)	Ac_01	0.0	<i>A. americanum</i>	DQ168131.1
	Ac_33	2×10^{127}	<i>A. cajennense</i>	AFU55265.1
	Ac_36	5×10^{-35}	<i>A. cajennense</i>	DQ168131.1
Subunidade II da citocromo c oxidase (COX2)	Ac_22	5×10^{-120}	<i>A. cajennense</i>	FJ860252.1
Subunidade III da citocromo c oxidase (COX3)	Ac_05	4×10^{-148}	<i>A. americanum</i>	DQ168133.1
Citocromo b	Ac_24	2×10^{-62}	<i>A. cajennense</i>	AFU55276.1
F0F1 ATPase subunidade 6	Ac_40	5×10^{-70}	<i>A. americanum</i>	ABA19091.1
No hit	Ac_32	-	-	-

4.3 Validação dos dados de SSH por RT-qPCR

Oligonucleotídeos específicos para alguns genes de *A. cajennense* identificados por SSH como modulados pela infecção de *R. rickettsii* ou ainda com base nos dados de EST (*Expressed Sequence Tag*) de glândulas salivares de *A. cajennense* (Batista et al., 2008) foram desenhados. Obtivemos sucesso na amplificação de produtos específicos e com tamanho esperado com os oligonucleotídeos para a subunidade I da citocromo c oxidase (COX1; Ac_03), subunidade IV da NADH desidrogenase (Ac_08), hebraeína, proteína com domínio Kunitz-type (papilina-like; Ac_06) e proteína ligante de histamina (Ac_07). Não foi observada amplificação nas reações com oligonucleotídeos específicos para os demais genes analisados.

Após a avaliação por PCR convencional, os oligonucleotídeos seguiram para as análises por RT-qPCR para que suas eficiências de amplificação fossem determinadas. Para tal, foram utilizadas diferentes diluições de cDNA como molde. Todos os pares de oligonucleotídeos tiveram amplificação detectada com até 6,25 ng de cDNA (máxima diluição analisada) e apresentaram eficiências acima de 98%, com exceção apenas do par de oligonucleotídeos para a proteína ligante de histamina (Ac_07). Similarmente, os oligonucleotídeos para a proteína S3A apresentaram eficiência acima de 98%. Dessa maneira, foi possível utilizar o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme interpretação apresentada por (Livak, Schmittgen, 2001), para determinar os níveis de expressão dos genes selecionados em carrapatos infectados em comparação com carrapatos não infectados (**Figura 3A**). No entanto,

como a expressão do gene codificador da proteína papilina-*like* (Ac_06) é baixa em carrapatos não infectados, sua análise foi realizada por quantificação absoluta (Figura 3B). Os dados obtidos por RT-qPCR confirmaram os dados de SSH, mostrando que, de fato, a expressão dos genes codificadores da subunidade I da citocromo c oxidase (COX1), da subunidade IV da proteína NADH desidrogenase e da papilina-*like* são significativamente induzidos pela infecção com *R. rickettsii*. Além disso, observamos que a expressão da hebraeína também é induzida nas glândulas salivares de carrapatos infectados (Figura 3A).

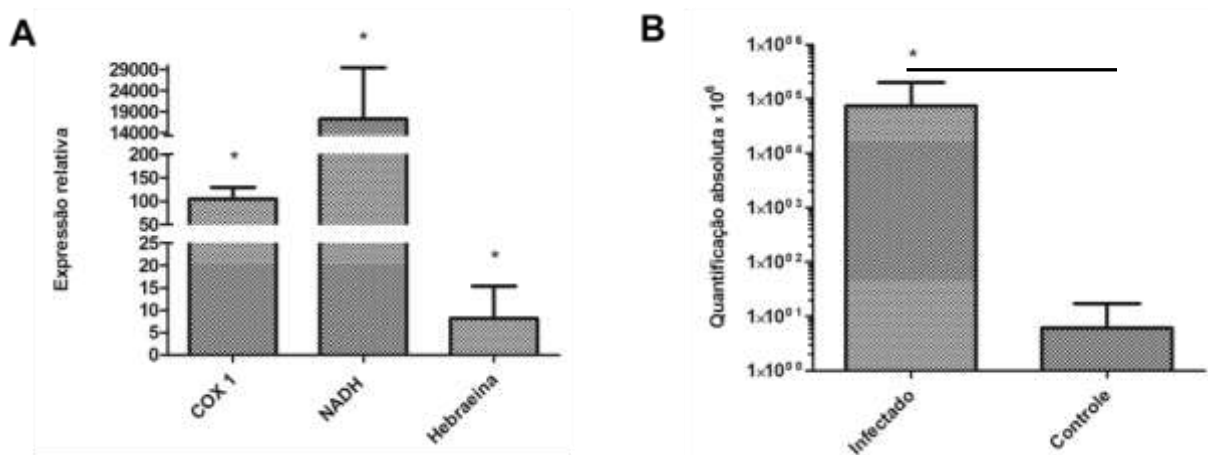


Figura 3. Análise do perfil de expressão gênica de fêmeas adultas de *A. cajennense* infectadas com *R. rickettsii* avaliada por RT-qPCR. (A) Expressão relativa da COX1 (Ac_03), subunidade IV da NADH desidrogenase (Ac_08) e hebraeína. A quantidade de cDNA nas amostras foi normalizada de acordo com a 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 de transcritos da proteína com domínio Kunitz-*type* (Ac_06). A quantidade de cDNA nas amostras foi normalizada de acordo com o número de cópias do gene controle (proteína ribossômica S3A). *: diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle pelo teste T de Student ($p < 0,05$).

4.4 Análise dos efeitos do silenciamento gênico da hebraeína e do inibidor Kunitz-*type* (Ac_06) na aquisição de *R. rickettsii*

Após a avaliação dos efeitos da infecção sobre o perfil de expressão gênica dos carrapatos, iniciamos os estudos funcionais. Para tal, avaliamos os efeitos do silenciamento da hebraeína e da papilina-*like* (Ac_06) na aquisição da infecção de *R. rickettsii* por fêmeas de *A. cajennense*.

Primeiramente, avaliamos os efeitos da microinjeção da dsRNA na viabilidade dos carrapatos e determinamos a eficiência de silenciamento. Para tal, a dsRNA

para a hebraeína ou para o gene controle (MSP1) foi administrada a ninfas. Verificou-se uma mortalidade de aproximadamente 90% das ninfas 24 h após a administração das dsRNA. O RNA de algumas ninfas sobreviventes foi extraído e analisado por RT-qPCR com oligonucleotídeos específicos para a hebraeína, mostrando que a expressão desse gene havia sido reduzida em aproximadamente 87% (**Figura 4**; ninfas 24h ai). As demais ninfas sobreviventes permaneceram na BOD até a muda para o estágio adulto. Os adultos foram, então, alimentados em cobaias infectadas. Após 3 dias, as glândulas salivares foram dissecadas. O DNAg e RNA total foram extraídos a fim de se observar a aquisição da bactéria *R. rickettsii* pelos carrapatos e para verificar nível de silenciamento gênico, respectivamente. Interessantemente, o silenciamento permaneceu mesmo após a ecdise para a fase adulta, tendo atingido nessa fase um percentual de redução de 99% (**Figura 4**; adultos SG am). Apesar do pronunciado silenciamento obtido, nenhum carrapato adquiriu *R. rickettsii*.

Um novo experimento foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos do silenciamento da hebraeína na aquisição da bactéria *R. rickettsii* diretamente na fase adulta. As dsRNA da hebraeína ou da MSP1 foram administradas a fêmeas adultas. Após 24 h, foi observada sobrevivência de 100% dos carrapatos, que foram colocados para se alimentar sobre coelhos infectados. Todas as fêmeas aderiram imediatamente à pele do hospedeiro. Embora o silenciamento da expressão da hebraeína tenha sido de 92% 3 dias após a alimentação (**Figura 4**; adultos SG 3d aa), nenhuma das fêmeas tanto do grupo controle (MSP1) quanto do grupo silenciado para a hebraeína apresentou infecção por *R. rickettsii*. O experimento foi repetido mais uma vez, visando a ampliação do número de réplicas biológicas. Novamente, nenhuma das fêmeas analisadas adquiriu a bactéria *R. rickettsii*, apesar do pronunciado silenciamento (87%) também no intestino (**Figura 4**; adultos MG 3d aa).

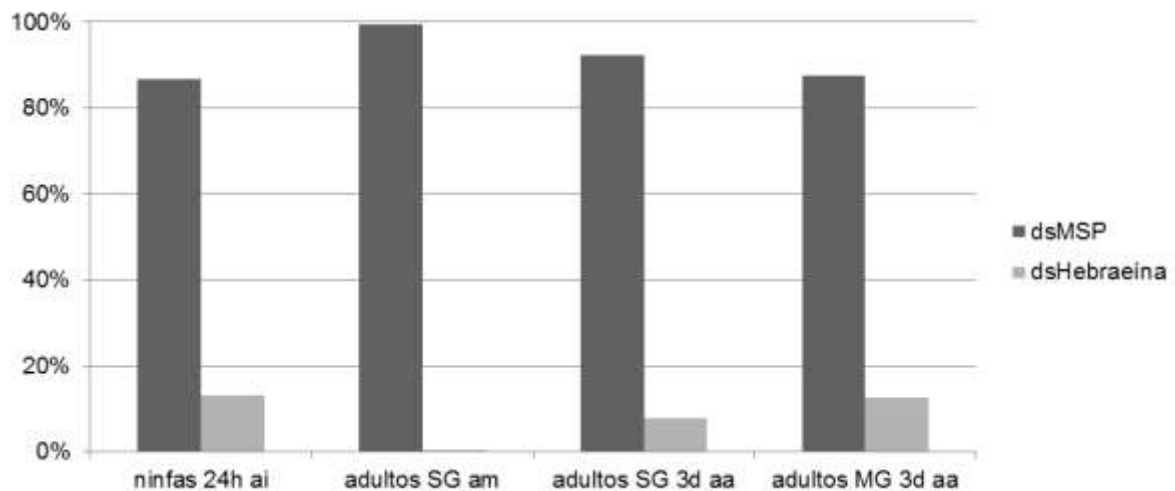


Figura 4. Silenciamento gênico do PAM hebraeína por RNA de interferência (RNAi). Avaliação do silenciamento gênico da hebraeína em ninfas 24 h após a injeção (ai), nas glândulas salivares (SG) de fêmeas adultas após a muda (am), nas glândulas salivares (SG) e intestino (MG) de fêmeas adultas de *A. cajennense* 3 dias após a alimentação (aa). O nível de transcritos da hebraeína em adultos de *A. cajennense* injetados com a dsRNA para a hebraeína ou para a MSP1 de *P. falciparum* (controle) foram avaliados por RT-qPCR. A quantidade de cDNA nas amostras foi normalizada de acordo com a expressão da proteína ribossômica S3A e o nível de silenciamento calculado considerando-se o nível do grupo controle como 100%.

Também avaliamos os efeitos do silenciamento da papilin-like (Ac_06) na aquisição da bactéria *R. rickettsii* por fêmeas adultas. Foi observada a sobrevivência de 100% dos carrapatos injetados, que após 24 h, foram colocados para se alimentar sobre coelhos infectados. Todas as fêmeas aderiram imediatamente à pele do hospedeiro. No entanto, nenhuma adquiriu a infecção por *R. rickettsii* após 3 dias de alimentação. Como transcritos da proteína Ac_06 só são observados em carrapatos infectados, não foi possível determinar o nível de silenciamento.

5 DISCUSSÃO

A transmissão de patógenos adquiridos a partir de um hospedeiro infectado tem que superar diversas barreiras no carrapato, incluindo o intestino, a hemocele, as glândulas salivares e o ovário (no caso de transmissão transovariana). Cada um desses tecidos pode desempenhar um papel decisivo na competência vetorial do carrapato para um determinado patógeno (Hajdušek et al., 2013; Ueti et al., 2007). No presente estudo, as glândulas salivares foram inicialmente escolhidas para as análises de expressão gênica diferencial, pois a transmissão de patógenos, assim como a alimentação sanguínea, são processos dependentes das moléculas farmacologicamente ativas produzidas por esse órgão e secretadas na saliva (Brossard, Wikel, 2004; Valenzuela, 2004). Além disso, como dito anteriormente, as glândulas salivares não são apenas sítios onde as riquetsias são coletadas antes da transmissão para o hospedeiro vertebrado, mas atuam como órgãos amplificadores da infecção (Socolovschi et al., 2009).

Um estudo sobre o perfil transcricional de glândulas salivares do carrapato *A. cajennense* já foi relatado anteriormente, com foco principalmente em proteínas envolvidas no processo hemostático, como coagulação sanguínea, agregação plaquetária e contração vascular, além de imunidade do hospedeiro, inflamação, proteases e seus inibidores (Batista et al., 2008). Porém, esse estudo não correlacionou a transcrição com os efeitos de infecção por patógenos. Já os estudos que analisaram os efeitos da infecção sobre a transcrição gênica de carrapatos, utilizaram *Rickettsia montanensis* (Macaluso et al., 2003; Mulenga et al., 2003). Como *R. montanensis* parece ser avirulenta para os carrapatos, assim como para humanos e outros animais (Macaluso et al., 2002), os dados são de difícil transposição para o estudo da relação *R. rickettsii*-carrapato vetor.

Dessa maneira, nosso grupo de pesquisa avaliou, pela primeira vez, os efeitos da infecção pela bactéria *R. rickettsii* sobre o perfil de expressão gênica de seu vetor primário no Brasil, o carrapato *A. cajennense*. Primeiramente, realizamos a infecção de carrapatos com *R. rickettsii*. Para tal, as larvas, ninfas e adultos foram alimentados sobre coelhos infectados. No entanto, apenas 9,6% dos carrapatos adultos obtidos adquiriram *R. rickettsii*. Esse resultado condiz com os dados previamente reportados por (Labruna et al., 2008), que relata que apenas 10 a 60%

de carrapatos *A. cajennense* adquirem a bactéria *R. rickettsii* em infecções experimentais. O RNA extraído das glândulas salivares de carrapatos infectados e não infectados (controle) foi utilizado para a construção de bibliotecas subtrativas de cDNA por SSH. A análise bioinformática dos dados obtidos mostrou que a infecção modulou a expressão de diversos genes nas glândulas salivares de *A. cajennense* (**Tabelas 5 e 6**).

As sequências Ac_07 e Ac_42, induzidas pela infecção, codificam proteínas ligantes de histamina (**Tabela 5**). Proteínas ligantes de histamina (do inglês *histamine binding proteins*, HBP) são secretadas na saliva de carrapatos para neutralizar os efeitos da inflamação causada pela histamina, a qual é secretada pelas células do sistema imune do hospedeiro no local da picada do carrapato (Paesen et al., 2000, 1999). Dessa forma, é possível que a indução da expressão gênica de HBP favoreça a alimentação de *A. cajennense* e, conseqüentemente, a transmissão da bactéria. No entanto, dada a baixa eficiência dos oligonucleotídeos para a sequência Ac_07, não foi possível validar a indução de sua expressão por RT-qPCR. Diversas HBP foram previamente descritas em carrapatos. Paesen e colaboradores (1999) identificaram três HBP gênero-específicas secretadas pela glândula salivar de *R. appendiculatus*. Interessantemente, foi observada a indução de HBP pela infecção de *D. variabilis* por *R. montanensis* (Mulenga et al., 2003), de *I. scapularis* por *B. burgdorferi* (Dai et al., 2010). Diferentemente do observado para *A. cajennense*, a infecção de carrapatos *A. aureolatum* por *R. rickettsii* reprimiu a expressão de uma HBP (Malossi, 2013). A sequência Ac_14, também induzida pela infecção (**Tabela 5**), codifica uma proteína putativa secretada com 8,9 kDa. Essas proteínas pertencem a uma família de polipeptídeos exclusiva de carrapatos ixodídeos, com membros previamente descritos em *A. maculatum* e *R. appendiculatus* (Francischetti et al., 2009; Karim et al., 2011). Porém, sua função ainda é desconhecida.

Conforme apresentado na seção Resultados, diversos genes codificadores de proteínas mitocondriais também foram modulados pela infecção. Importaneamente, a análise da COX1 (Ac_03) e da NADH desidrogenase (Ac_08) por RT-qPCR confirmou que as mesmas são mais expressas nas glândulas salivares de carrapatos infectados que nas glândulas de carrapatos não infectados. A NADH desidrogenase é a primeira enzima do complexo I da fosforilação oxidativa,

localizada na membrana interna das mitocôndrias, catalisando a transferência de elétrons de NADH para a coenzima Q (Efremov et al., 2010; Nelson, Cox, 2000). Já a enzima COX constitui o complexo IV dessa mesma via, reduzindo oxigênio à água, enquanto a ATP sintase F₀F₁, ou complexo V, compõe a enzima final do processo, produzindo ATP (Boyer, 1997; Nelson, Cox, 2000).

Durante a transferência de elétrons que ocorre na fosforilação oxidativa, os prótons são translocados simultaneamente da matriz para o espaço intermembranar mitocondrial pelos complexos I, III e IV. Esta translocação de prótons cria um gradiente eletroquímico e a força próton-motriz provida pela translocação de prótons de volta para a matriz é utilizada pelo complexo V (ATP sintase F₀F₁) para gerar ATP (Diaz, 2010). No transporte de elétrons na cadeia respiratória, pode ocorrer vazamento de elétrons e, ao invés de quatro prótons e quatro elétrons se reunirem a uma molécula de O₂ para a formação de H₂O, há a incorporação de apenas um elétron por vez, liberando formas parcialmente reduzidas de oxigênio (West et al., 2011). Assim, a indução de enzimas mitocondriais pode estar associada com a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela cadeia respiratória.

Estudos anteriores mostraram que a infecção do carrapato *Ixodes ricinus* com a espiroqueta *B. burgdorferi* induz a expressão de genes codificadores da COX em intestino, glândulas salivares e em hemócitos. Os autores discutem que esse fenômeno pode estar relacionado com a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), originada após alimentação sanguínea (Rudenko et al., 2005). A COX também foi induzida em resposta à infecção de *A. marginale* em *R. microplus* [(de la Fuente et al., 2007a; Mercado-Curiel et al., 2011; Zivkovic et al., 2010) e Dra. Thaís Duarte Bifano, comunicação pessoal]. Interessantemente, a COX1 está 100 vezes mais expressa em carrapatos *A. cajennense* infectados em relação aos não infectados. No caso da NADH desidrogenase, essa indução é ainda mais pronunciada, sendo o nível de transcritos 17.000 vezes maior em carrapatos infectados. Em *A. aureolatum*, a indução da COX1 foi de apenas duas vezes maior em carrapatos infectados em relação aos não-infectados (Malossi, 2013). Assim, é possível que a produção de ERO ou ainda outros mecanismos mitocondriais estejam envolvidos na refratariedade de *A. cajennense* à *R. rickettsii*.

Interessantemente, as sequências Ac_06 e Ac_13, induzidas pela infecção, possuem domínios Kunitz-*type*. Esse resultado corrobora com dados transcricionais

do carrapato *A. aureolatum* frente à infecção pelo mesmo patógeno, no qual também foi observada a indução de proteínas com domínio de inibidor Kunitz-*type* (Malossi, 2013). Importaneamente, nossos resultados de RT-qPCR confirmaram a indução de genes codificadores de proteínas com domínio Kunitz-*type* nas glândulas salivares de *A. cajennense* (**Figura 3B**) e *A. aureolatum* (Malossi, 2013). No entanto, em virtude dos baixos níveis em que esse gene é transcrito não infectados, utilizamos o método de quantificação absoluta para as duas espécies de carrapatos.

O primeiro inibidor Kunitz-*type* descrito é o inibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) (Kunitz, Northrop, 1936). Em carrapatos, diversos inibidores da família Kunitz já foram isolados de diferentes tecidos, apresentando um amplo espectro de funções biológicas (Francischetti et al., 2009). Além disso, a anotação de sialotranscriptomas de carrapatos apontaram diversas proteínas com domínio Kunitz-*type* conservado (Francischetti et al., 2009; Ribeiro et al., 2006; Valenzuela et al., 2002). As funções das proteínas com domínio de inibidor Kunitz-*type* variam desde inibição da via extrínseca da coagulação sanguínea (Corral-Rodríguez et al., 2009), inibição de canais iônicos (Lucchesi, Moczydlowski, 1991), vasodilatação (Paesen et al., 2009), e inibição enzimática (Sasaki, Tanaka, 2008). Como são secretados na saliva, a qual é inoculada pelos carrapatos durante a alimentação, e inibem a coagulação do sangue, como mencionado anteriormente, essas proteínas facilitam e garantem a fluidez do sangue (Francischetti et al., 2002, 2004; Nazareth et al., 2006). Também foi relatada a presença de um inibidor Kunitz-*type* em *H. longicornis* que modula a angiogênese, podendo também facilitar a alimentação sanguínea (Islam et al., 2009).

A indução da síntese de uma família de inibidores Kunitz-*type* também foi observada em ovários de *R. microplus* após a infecção pelo protozoário *Babesia bovis* (Rachinsky et al., 2007). Além disso, foi relatado que o inibidor Kunitz-*type* de *D. variabilis* (DvKPI) apresenta uma atividade bacteriostática contra *R. montanensis* *in vitro* (Ceraul et al., 2008). Mais recentemente, foi demonstrado que DvKPI limita a quantidade de *R. montanensis* *in vivo*, uma vez que o silenciamento desse gene em carrapatos resultou em um aumento da infecção (Ceraul et al., 2011). De fato, 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, desempenhando um papel importante na imunidade tanto de vertebrados quanto de invertebrados (Armstrong, 2001).

Apesar da modulação da hebraeína, um peptídeo antimicrobiano (PAM), não ter sido detectada por SSH, uma análise preliminar do nosso grupo de pesquisa havia mostrado que níveis de seus transcritos aumentam nas glândulas salivares de fêmeas adultas de *A. cajennense* infectadas por *R. rickettsii* (dados não apresentados). A análise desse gene por RT-qPCR demonstrou que o mesmo é induzido pela infecção em glândulas salivares de *A. cajennense*. Além disso, sua expressão também é induzida nas glândulas salivares e intestinos tanto de fêmeas como machos de *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii* (Malossi, 2013).

Os PAM são importantes componentes do sistema imunitário tanto de vertebrados como de invertebrados, agindo diretamente contra uma vasta diversidade de patógenos (Yeung et al., 2011). A expressão gênica dos PAM pode ser constitutiva ou induzida após uma infecção por microrganismos, ou ainda por padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), tais como os lipopolissacarídeos (LPS) (Bulet et al., 2004). A grande maioria do PAM é catiônica e anfipática, o que faz com que a membrana bacteriana, negativamente carregada, seja geralmente o seu principal alvo (Shai, 1999; Sitaram, Nagaraj, 1999).

As microplusinas/hebraeínas são PAM ricos em resíduos de cisteína e histidinas. O primeiro PAM dessa classe descrito na literatura é a microplusina, isolada da hemolinfa de *R. microplus*. A expressão gênica da microplusina foi detectada em hemócitos, corpo gorduroso, ovários e ovos dessa espécie de carrapato (Fogaça et al., 2004; Esteves et al., 2009). Também já foi demonstrado que a microplusina não afeta a permeabilidade da membrana microbiana. Em vez disso, possui a propriedade de quelar os íons de cobre, os quais são necessários para a respiração bacteriana. Assim, o efeito bacteriostático de microplusina contra *Micrococcus luteus* e fungistático contra *Cryptococcus neoformans* devem-se, então, a um processo cobre-dependente (Silva et al., 2009, 2011).

A hebraeína é um PAM similar à microplusina, tendo sido identificada em *Amblyomma hebraeum* (Fogaça et al., 2004; Lai et al., 2004). A análise das sequências de aminoácidos da hebraeína de *Amblyomma cajennense* apresenta alta identidade com a hebraeína de *A. hebraeum* (72%) e o peptídeo sinal, que

hospedeiro e a taxa de ingurgitamento, mas não comprometeu a alimentação sanguínea (Gao et al., 2011). Assim, os autores sugerem que outras proteínas na saliva possivelmente supram a ausência da rhipilin-1.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, apresentamos os efeitos da infecção com *Rickettsia rickettsii*, o agente etiológico da riquetsiose mais grave que acomete o homem, sobre seu vetor primário em toda a América Latina, *Amblyomma cajennense*. Para os experimentos, os carrapatos foram infectados pela alimentação em seus hospedeiros infectados, o que mimetiza uma infecção natural. Como essa espécie de carrapato não possui genoma anotado, os dados aqui gerados também são importantes para somar informações de sequências disponíveis, tanto de proteínas hipotéticas como de proteínas com função previamente anotada. Em conjunto, nossos dados mostram que a infecção por *R. rickettsii* modula a expressão de diversos genes das glândulas salivares de *A. cajennense*. Porém, o silenciamento gênico da hebraeína e de uma proteína com domínio de inibidor Kunitz-type (papilina), isoladamente, não são responsáveis pela proteção do carrapato contra a bactéria. Os dados obtidos pelo presente estudo também permitem que outros genes alvos sejam avaliados quanto ao seu papel na aquisição de *R. rickettsii*, os quais, no futuro, podem ser considerados como alvos para o desenvolvimento de vacinas.

REFERÊNCIAS*

- Aljamali MN, Sauer JR, Essenberg RC. RNA interference: applicability in tick research. *Exp Appl Acarol*. 2002;28:89–96.
- Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine*. 2003;21:1492–501.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:3389–402.
- Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am*. 2008;22:195–215.
- Angerami RN, Resende MR, Feltrin AFC, Katz G, Nascimento EM, Stucchi RSB, Silva LJ. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil: epidemiological aspects. *Ann NY Acad Sci*. 2006a;1078:170–2.
- Angerami RN, Resende MR, Feltrin AFC, Katz G, Nascimento EM, Stucchi RSB, Silva LJ. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil: clinical aspects. *Ann NY Acad Sci*. 2006b;078:252–4.
- Armstrong PB. The contribution of proteinase inhibitors to immune defense. *Trends Immunol*. 2001;22:47–52.
- Aung KM, Boldbaatar D, Umemiya-Shirafuji R, Liao M, Xuenan X, Suzuki H, Galay RL, Tanaka T, Fujisaki K. Scavenger receptor mediates systemic RNA interference in ticks. *PLoS One*. 2011;6:e28407.
- Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis*. 1998;4:179–86.
- Barker SC, Murrell A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*. 2004;129:15–36.
- Barry G, Alberdi P, Schnettler E, Weisheit S, Kohl A, Fazakerley JK, Bell-Sakyi L. Gene silencing in tick cell lines using small interfering or long double-stranded RNA. *Exp Appl Acarol*. 2012.
- Batista IFC, Chudzinski-Tavassi AM, Faria F, Simons SM, Barros-Batesti DM, Labruna MB, Leão LI, Ho PL, Junqueira-de-Azevedo ILM. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon*. 2008;51:823–34.

*De acordo com:

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

- Belmonte R, Cruz CE, Pires JR, Daffre S. Purification and characterization of Hb 98-114: a novel hemoglobin-derived antimicrobial peptide from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Peptides*. 2012;37:120–7.
- Bendtsen JD, Nielsen H, Von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*. 2004;340:783–95.
- Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:573–80.
- Blanton LS. Rickettsial infections in the tropics and in the traveler. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26:435–40.
- Boguski MS, Tolstoshev CM, Bassett DE. Gene discovery in dbEST. *Science*. 1994;265:1993–4.
- Boyer PD. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:717–49.
- Brossard M, Wikel SK. Tick immunobiology. *Parasitology*. 2004;129:161–76.
- Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*. 2004;198:169–84.
- Buresová V, Franta Z, Kopáček P. A comparison of *Chryseobacterium indologenes* pathogenicity to the soft tick *Ornithodoros moubata* and hard tick *Ixodes ricinus*. *J Invertebr Pathol* 2006;93:96–104.
- Buresova V, Hajdusek O, Franta Z, Loosova G, Grunclova L, Levashina EA, Kopacek P. Functional genomics of tick thioester-containing proteins reveal the ancient origin of the complement system. *J Innate Immun*. 2011;3:623–30.
- Buresova V, Hajdusek O, Franta Z, Sojka D, Kopacek P. IrAM-An alpha2-macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus*: characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen *Chryseobacterium indologenes*. *Dev Comp Immunol*. 2009;33:489–98.
- Burgdorfer W, Brinton LP. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever *Rickettsiae* in ticks. *Ann NY Acad Sci*. 1975;266:61–72.
- Burgdorfer W, Hayes SF, Benach JL. Development of *Borrelia burgdorferi* in ixodid tick vectors. *Ann NY Acad Sci*. 1988;539:172–9.
- Cardoso LD, Freitas RN, Mafra CL, Neves CVB, Figueira FCB, Labruna MB, Gennari SM, Walker DH, Galvão MAM. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2006;22:495–501.

Carpi G, Cagnacci F, Wittekindt NE, Zhao F, Qi J, Tomsho LP, Drautz DI, Rizzoli A, Schuster SC. Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS One*. 2011;6:e25604.

Ceraul SM, Chung A, Sears KT, Popov VL, Beier-Sexton M, Rahman MS, Azad AF. A Kunitz protease inhibitor from *Dermacentor variabilis*, a vector for spotted fever group rickettsiae, limits *Rickettsia montanensis* invasion. *Infect Immun*. 2011;79:321–9.

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

Ceraul SM, Dreher-Lesnack SM, Mulenga A, Rahman MS, Azad AF. Functional characterization and novel rickettsiostatic effects of a Kunitz-type serine protease inhibitor from the tick *Dermacentor variabilis*. *Infect Immun*. 2008;76:5429–35.

Ceraul SM, Sonenshine DE, Ratzlaff RE, Hynes WL. An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol*. 2003;33:1099–1103.

Chapman AS, Murphy SM, Demma LJ, Holman RC, Curns AT, McQuiston JH, Krebs JW, Swerdlow DL. Rocky Mountain spotted fever in the United States, 1997-2002. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2006;6:170–8.

Chen LF, Sexton DJ. What's new in Rocky Mountain spotted fever? *Infect Dis Clin North Am*. 2008;22:415–32.

Corral-Rodríguez MA, Macedo-Ribeiro S, Barbosa Pereira PJ, Fuentes-Prior P. Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. *Insect Biochem Mol Biol* 2009;39:579–95.

Dai J, Narasimhan S, Zhang L, Liu L, Wang P, Fikrig E. Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the Lyme disease agent. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1001205.

Dantas-Torres F. Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infect. Dis*. 2007;7:724–32.

Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol*. 2012;28:437–446.

Dantas-Torres F, Venzal JM, Bernardi LFO, Ferreira RL, Onofrio VC, Marcili A, Bermúdez SE, Ribeiro AF, Barros-Battesti DM, Labruna MB. Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. *J Parasitol*. 2012;98:36–45.

De la Fuente J, Almazán C, Blouin EF, Naranjo V, Kocan KM. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitol Res*. 2005;96:137–41.

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

De la Fuente J, Kocan KM, Almazán C, Blouin EF. RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks. *Trends Parasitol*. 2007b;23:427–33.

De la Fuente J, Moreno-Cid JA, Canales M, Villar M, de la Lastra JMP, Kocan KM, Galindo RC, Almazán C, Blouin EF. Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Vet Parasitol*. 2011;181:17–22.

De la Fuente J, Moreno-Cid JA, Galindo RC, Almazan C, Kocan KM, Merino O, Perez de la Lastra JM, Estrada-Peña A, Blouin EF. Subolesin/Akirin Vaccines for the Control of Arthropod Vectors and Vectorborne Pathogens. *Transbound Emerg Dis*. 2013;60:172–178.

De Lemos ERS, Rozental T, Villela CL. Brazilian spotted fever: description of a fatal clinical case in the State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35:523–5.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:6025–30.

Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol*. 1999;303:349–80.

Diaz F. Cytochrome c oxidase deficiency: patients and animal models. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802:100–10.

Dreher-Lesnick SM, Mulenga A, Simser JA, Azad AF. Differential expression of two glutathione S-transferases identified from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Mol Biol* 2006;15:445–53.

Durham AM, Kashiwabara AY, Matsunaga FTG, Ahagon PH, Rainone F, Varuzza L, Gruber A. EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. *Bioinformatics*. 2005;21:2812–3.

Efremov RG, Baradaran R, Sazanov LA. The architecture of respiratory complex I. *Nature*. 2010;465:441–5.

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

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

Estripeaut D, Aramburú MG, Sáez-Illórens X, Thompson HA, Dasch GA, Paddock, CD, Zaki S, Ereemeeva ME. Rocky mountain spotted fever, Panama. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1763–65.

Flicek BF. Rickettsial and other tick-borne infections. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2007;19:27–38.

Fogaça AC, Almeida IC, Eberlin MN, Tanaka AS, Bulet P, Daffre S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides* 2006;27:667–74.

Fogaça AC, da Silva PI, Miranda MT, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PE, Daffre S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem*. 1999;274:25330–4.

Fogaça AC, Lorenzini DM, Kaku LM, 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*. 2004;28:191–200.

Francischetti IMB, Mather TN, Ribeiro JMC. Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thromb Haemost*. 2004;91:886–98.

Francischetti IMB, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JMC. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci*. 2009;14:2051–88.

Francischetti IMB, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JMC. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*. 2002;99:3602–12.

Fuentes LG. 1st case of Rocky Mountain fever in Costa Rica. *Central America Rev Latinoam Microbiol*. 1979;21:167–72.

Futse JE, Ueti MW, Knowles DP, Palmer GH. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. *J Clin Microbiol*. 2003;41:3829–34.

Galletti MFBM, Fujita A, Nishiyama MY, Malossi CD, Pinter A, Soares JF, Daffre S, Labruna MB, Fogaça AC. Natural Blood Feeding and Temperature Shift Modulate the Global Transcriptional Profile of *Rickettsia rickettsii* Infecting Its Tick Vector. *PLoS One*. 2013;8:e77388.

Galvão MAM, Silva LJ da, Nascimento EMM, Calic SB, Sousa R de, Bacellar F. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis. *Rev Saude Publica*. 2005;9:850–6.

Gao X, Shi L, Zhou Y, Cao J, Zhang H, Zhou J. Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the *Rhipicephalus haemaphysaloides* tick. *J Insect Physiol* 2011;57:339–43.

Greca H, Langoni H, Souza LC. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis, 2007. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2008;14:3–18.

Gudderra NP, Sonenshine DE, Apperson CS, Roe RM. Hemolymph proteins in ticks. *J Insect Physiol*. 2002;48:269–78.

Guedes E, Leite RC, Prata MCA, Pacheco RC, Walker DH, Labruna MB. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:841–5.

Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG, Shao R, Barker SC. Zootaxa, The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world. *Zootaxa*. 2010;28:1–28.

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

Hayes SF, Burgdorfer W, Aeschlimann A. Sexual Transmission of Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Immature Spermatozoa of *Ixodes ricinus*. *Infect Immun* 1980;27:638–642.

Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernandez J, Parra E, Keng C, Small M, Olano JP, Bouyer D, Castaneda E, Walker D, Valbuena G. Rocky Mountain spotted fever, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1058–60.

Horta MC, Moraes-Filho J, Casagrande RA, Saito TB, Rosa SC, Ogrzewalska M, Matushima ER, Labruna MB. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2009;9:109–18.

Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*. 1999;9:868–77.

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

Inoue N, Hanada K, Tsuji N, Igarashi I, Nagasawa H, Mikami T, Fujisaki K. Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 2001;38:514–9.

Islam MK, Tsuji N, Miyoshi T, Alim MA, Huang X, Hatta T, Fujisaki K. The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000497.

Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol.* 2004;338:1027–36.

Karim S, Singh P, Ribeiro JMC. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. *PLoS One.* 2011;6:e28525.

Kocan KM, Blouin E, de la Fuente J. RNA interference in ticks. *J Vis Exp.* 2011;47:1–5.

Kocan KM, de la Fuente J, Manzano-Roman, R, Naranjo, V, Hynes, W.L, Sonenshine, D.E, 2008. Silencing expression of the defensin, varisin, in male *Dermacentor variabilis* by RNA interference results in reduced *Anaplasma marginale* infections. *Exp Appl Acarol.* 2008;46:17–28.

Kocan, K.M, Zivkovic, Z, Blouin, E.F, Naranjo, V, Almazán, C, Mitra, R, de la Fuente, J, 2009. Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. *BMC Dev Biol* 2009;9:42.

Kopáček P, Hajdusek O, Buresová V, Daffre S, Kopáček P. Tick innate immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2010;708:137–62.

Kopáček P, Vogt R, Jindrák L, Weise C, Safarík I. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem Mol Biol.* 1999;29:989–97.

Kreil DP, Russell RR, Russell S. Microarray oligonucleotide probes. *Methods Enzymol.* 2006;410:73–98.

Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 2001;305:567–80.

Kunitz M, Northrop JH. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *J Gen Physiol.* 1936;19:991–1007.

Labruna MB. Ecology of rickettsia in South America. *Ann NY Acad Sci.* 2009;1166:156–66.

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

Labruna MB, Ogrzewalska M, Martins TF, Pinter A, Horta MC. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. *J Med Entomol.* 2008;45:1156–9.

Labruna MB, Terassini FA, Camargo LMA. Notes on population dynamics of *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) in Brazil. *J Parasitol.* 2009;95:1016–8.

Labruna MB, Venzal JM. *Carios fonsecai* sp. nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. *Acta Parasitol.* 2009;54:355–63.

Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH. *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.* 2004;42:90–98.

Lai R, Takeuchi H, Jonczyk J, Rees HH, Turner PC. A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Gene.* 2004;342:243–9.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25:402–8.

Löhr CV, Rurangirwa FR, McElwain TF, Stiller D, Palmer GH. Specific expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 salivary gland variants occurs in the midgut and is an early event during tick transmission. *Infect Immun.* 2002;70:114–120.

Loosová G, Jindrák L, Kopáček P. Mortality caused by experimental infection with the yeast *Candida haemulonii* in the adults of *Ornithodoros moubata* (Acarina: Argasidae). *Folia Parasitol (Praha).* 2001;48:149–53.

Lucchesi KJ, Moczydlowski E. On the interaction of bovine pancreatic trypsin inhibitor with maxi Ca⁽²⁺⁾-activated K⁺ channels. A model system for analysis of peptide-induced subconductance states. *J Gen Physiol.* 1991;97:1295–319.

Rey L. Bases da parasitologia médica, 4 ed. ed. Rio de Janeiro.2008

Macaluso KR, Mulenga A, Simser JA, Azad AF. Characterization of *Dermacentor variabilis* molecules associated with *Rickettsial* infection. *Ann NY Acad.Sci.* 2006;1078:384–8.

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

Macaluso KR, Sonenshine DE, Ceraul SM, Azad AF. Infection and transovarial transmission of rickettsiae in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2001;1:45–53.

Macaluso KR, Sonenshine DE, Ceraul SM, Azad AF. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. *J Med Entomol.* 2002;39:809–13.

Malossi CD. Efeitos da infecção por *Rickettsia rickettsii* sobre o perfil de expressão gênica do carrapato vetor *Amblyomma aureolatum*. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2013.

Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, Hao L, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Krylov D, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Thank, N, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:237–40.

Marchler-Bauer A, Panchenko AR, Shoemaker BA, Thiessen PA, Geer LY, Bryant SH. CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:281–3.

Mello CC, Conte D. Revealing the world of RNA interference. *Nature.* 2004;431:338–42.

Mercado-Curiel RF, Palmer GH, Guerrero FD, Brayton KA. Temporal characterisation of the organ-specific *Rhipicephalus microplus* transcriptional response to *Anaplasma marginale* infection. *Int. J Parasitol.* 2011;41:851–60.

Merhej V, Raoult D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2011;86:379–405.

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

Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lönne M, Walter JG, Stahl F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24:22–30.

Nakajima Y, Taylor D, Yamakawa M. Involvement of antibacterial peptide defensin in tick midgut defense. *Exp Appl Acarol.* 2002;28:135–140.

Nazareth RA, Tomaz LS, Ortiz-Costa S, Atella GC, Ribeiro JMC, Francischetti IMB, Monteiro RQ. Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. *Thromb Haemost.* 2006;96:7–13.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* Worth Publishers 2000;3:1013.

- Niebylski ML, Peacock MG, Schwan TG. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:773–8.
- Nijhof AM, Taoufik A, de la Fuente J, Kocan KM, de Vries E, Jongejan F. Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *Inter.* 2007;37:653–662.
- Nuttall PA. Molecular characterization of tick-virus interactions. *Front Biosci.* 2009;14:2466–83.
- Nuttall PA, Labuda M. Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology.* 2004;129:177–89.
- Paddock CD, Fernandez S, Echenique GA, Sumner JW, Reeves WK, Zaki SR, Remondogui CE. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78:687–92.
- Paesen GC, Adams PL, Harlos K, Nuttall PA, Stuart DI. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning and three-dimensional structure. *Mol Cell.* 1999;3:661–71.
- Paesen GC, Adams PL, Nuttall PA, Stuart DL. Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1482:92–101.
- Paesen GC, Siebold C, Dallas ML, Peers C, Harlos K, Nuttall PA, Nunn MA, Stuart DI, Esnouf RM. An ion-channel modulator from the saliva of the brown ear tick has a highly modified Kunitz/BPTI structure. *J Mol Biol.* 2009;389:734–47.
- Parola P, Labruna MB, Raoult D. Tick-borne rickettsioses in America: unanswered questions and emerging diseases. *Curr Infect Dis Rep.* 2009;11:40–50.
- Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:719–56.
- Pereira LS, Oliveira PL, Barja-Fidalgo C, Daffre S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Parasitol.* 2001;99:66–72.
- Perez CA, Almeida AFde, Almeida A, Carvalho VHB de, Balestrin DdoC, Guimarães MS, Costa JC, Ramos LA, Arruda-Santos AD, Máximo-Espíndola CP, Barros-Battesti DM. Ticks of genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) and their relationship with hosts in endemic area for spotted fever in the State of São Paulo. *Brazilian J Vet Parasitol.* 2008;17:210–7.
- Pinter A, Labruna MB, Faccini JLH. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. *Vet Parasitol.* 2002;105:79–88.
- Pinter A, Dias RA, Gennari SM, Labruna MB. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 2004;41:324–32.

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

Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:116–20.

Rachinsky A, Guerrero FD, Scoles GA. Differential protein expression in ovaries of uninfected and *Babesia*-infected southern cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2007;37:1291–308.

Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Cli. Microbio. Rev.* 1997;10:694–719.

Ribeiro JMC, Alarcon-Chaidez F, Francischetti IMB, Mans BJ, Mather TN, Valenzuela JG, Wikel SK. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem Mol Biol.* 2006;36:111–29.

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

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

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

Sanavria A, Prata MCA. Metodologia para colonizacao de *A. cajennense* em laboratório. *Rev Bras Parasitol.* 1996;5:87–90.

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

Santos AS, Bacellar F, Santos-Silva M, Formosinho P, Grácio AJ, 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.* 2002;2:165–77.

Sasaki SD, Tanaka AS. rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick *Boophilus microplus*, its cloning, expression and biochemical characterization. *Vet Parasitol.* 2008;155:133–41.

Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1462:55–70.

Silva FD, Rezende CA, Rossi DCP, Esteves E, Dyszy FH, Schreier S, Gueiros-Filho F, Campos CB, Pires JR, 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*. 2009;284:34735–46.

Silva FD, Rossi DCP, Martinez LR, Frases S, Fonseca FL, Campos CBL, Rodrigues ML, Nosanchuk JD, Daffre S. Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;324:64–72.

Sitaram N, Nagaraj R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim Biophys Acta* 1999;1462:29–54.

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

Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. The relationship between spotted fever group *Rickettsiae* and ixodid ticks. *Vet Res*. 2009;40:34.

Sojka D, Franta Z, Horn M, Caffrey CR, Mareš M, Kopáček P. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends Parasitol*. 2013;29:276–85.

Sonenshine DE. *Biology of Ticks*, Volume 1. Oxford University Press. 1991

Sonenshine DE, Ceraul SM, Hynes WE, Macaluso KR, Azad AF. Expression of defensin-like peptides in tick hemolymph and midgut in response to challenge with *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Exp Appl Acarol* 2002;28:127–34.

Sonenshine DE, Hynes WL. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Front Biosci*. 2008;13:7046–63.

Sonenshine DE, Hynes WL, Ceraul SM, Mitchell R, Benzine T. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. *Exp Appl Acarol*. 2005;36:207–23.

Souza CE, Moraes-Filho J, Ogrzewalska M, Uchoa FC, Horta MC, Souza SSL, Borba RCM, Labruna MB. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vet Parasitol*. 2009;161:116–21.

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

Ueti MW, Reagan JO, Knowles DP, Scoles GA, Shkap V, Palmer GH. Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun*. 2007;75:2959–64.

- Valenzuela JG. Exploring tick saliva: from biochemistry to “sialomes” and functional genomics. *Parasitology* 2004;129:83–94.
- Valenzuela JG, Francischetti IMB, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JMC. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J Exp Biol.* 2002;205:2843–64.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science.* 1995;270:484–7.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10:57–63.
- West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:389–402.
- Yeung ATY, Gellatly SL, Hancock REW. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68:2161–76.
- Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Walker DH, Ruiz Arcila EE, Laviada-Molina H, Olano JP, Ruiz-Sosa JA, Small MA, Dzul-Rosado KR. Fatal human infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2006;12:672–4.
- Zdobnov EM, Apweiler R. InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics.* 2001;17:847–8.
- Zivkovic Z, Esteves E, Almazán C, Daffre S, Nijhof AM, Kocan KM, Jongejan F, de la Fuente J. Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale*. *BMC Genomics.* 2010;11:186.