

JANAÍNA CAPELLI PEIXOTO

**VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DO CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus microplus***

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

São Paulo
2016

JANAÍNA CAPELLI PEIXOTO

**VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DO CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus microplus***

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Sirlei Daffre

Versão original

São Paulo
2016

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Capelli Peixoto, Janaina
VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DO CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus*
microplus / Janaina Capelli Peixoto; orientador
Sirlei Daffre. -- São Paulo, 2016.
150 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. carrapatos. 2. imunidade inata. 3. vias de
sinalização. 4. *Anaplasma marginale*. 5.
Rhipicephalus microplus. I. Daffre, Sirlei ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Janaína Capelli Peixoto

Título da Tese: Vias de sinalização envolvidas na resposta imunológica do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*

Orientador(a): Dra. Sirlei Daffre

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 489/11 referente ao projeto intitulado: "*Vias de sinalização envolvidas na resposta imunológica do carrapato bovino Rhipicephalus (Boophilus) microplus*" sob a responsabilidade de **Janáina Capelli Peixoto**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 21 de novembro de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Ao meu marido, aos meus pais e ao meu irmão.
Pessoas fundamentais na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Universo, por sempre conspirar a meu favor.

À minha mãe Ecléia, pai Cláudio e irmão João Victor, por todo apoio e incentivo. Mesmo sem muita simpatia pelos carrapatos, vocês sempre se mostraram muito interessados no meu trabalho e sempre acreditaram no meu potencial. Como diria Rubem Alves, vocês aprenderam a abraçar à distância, comemorar vitórias das quais não participam diretamente e apoiar decisões que caminham pra longe. Isso é amor! Obrigada por tudo e mais um pouco! Eu amo vocês!

Ao meu marido Marcelo, pela dedicação, compreensão, paciência, incentivo, companheirismo e por todo o bem que me faz. Sem ele por perto as coisas não teriam a mesma graça. Agradeço por ele ser assim, bem do jeitinho que é! Eu amo você!

Ao Programa de Pós-Graduação Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão das bolsas de estudo e apoio financeiro.

À professora Dra. Sirlei Daffre pela oportunidade de desenvolver esta tese sob sua orientação, por sempre demonstrar disposição para discussões e por todo aprendizado que certamente me fizeram amadurecer pessoal e profissionalmente.

À professora Dra. Andréa C. Fogaça, por toda contribuição neste trabalho e por ter revisado parte deste documento com cuidado e carinho.

Ao professor Dr. Rafael Diego da Rosa, pela amizade, confiança e por ter me ensinado como se monta uma placa de real time PCR com perfeição. Obrigada também por ter iniciado este trabalho, com as buscas das sequências e análises de bioinformática.

Aos professores Dra. Glória Braz e Dr. Rafael Mesquita, ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelas análises de bioinformática.

Ao professor Dr. Milton O. Moraes, do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro, pela atenção desprendida e por permitir o uso da plataforma Fluidigm.

À Dra. Eliane Esteves que revisou parte deste documento, com tanto carinho e dedicação. Obrigada por sua amizade e pelas palavras de apoio!

Ao Dr. Carlos Cruz pelas edições dos textos em inglês.

À Dra Rosangela Zacaria Machado da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) e aos Dr Guilherme Marcondes Klafke e Dr José Reck Junior do Instituto

de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), pelos inóculos de sangue infectado com *Anaplasma marginale*.

Aos técnicos Dr. Mario Balanco, pelo apoio no cultivo celular e à Dra Claudia Angeli, pelas compras dos reagentes e boa vontade em organizar o laboratório.

Às queridas secretárias Silvia, Dalva e Sabrina, por toda ajuda burocrática, conversas agradáveis e boas risadas.

Ao professor Dr. Gerhard Wunderlich do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por ceder os plasmídeos ligados com GFP.

Aos professores membros da banca de qualificação Dr. Marcos Sorgine, Dr. André Pitaluga e Dr. Mauro Cortez, por todas as colocações, orientações e dicas.

Ao Dr. Massaro W. Ueti por me receber tão bem em seu laboratório, pela confiança, apoio e supervisão durante o desenvolvimento de uma parte desta tese nos Estados Unidos.

Aos técnicos Wendell Carl Johnson e Paul Lacy por toda ajuda na compra e empréstimos de materiais, além de discussões de protocolos. Agradeço também ao Ralph Horn e James Allison pelo cuidado com os animais utilizados nos experimentos nos Estados Unidos.

Aos Dr. Donald Knowles, Dr. Glen A. Scoles e Dr. Carlos Soares pelas reuniões e discussões sempre muito proveitosas.

À Danielle Carvalho pelas análises estatísticas.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Imunologia de Artrópodes, pessoas especiais que tive o prazer de conhecer: Eliane, Thaís, Paula, Carlos, Sandra, Rafael, Adne, Elisa, Letícia, Gustavo, Mario Balanco, Mario Pacheco, Claudia, Maria Fernanda, Camila, Flávia e Larissa.

Aos amigos que o doutorado me trouxe e que fazem meus dias mais felizes: Sandra Kalil, Eliane Esteves, Lina Borda, Ismael Sauter, Camila Lucena, Daiane Oldiges, Thaís Bifano e Paula Pohl.

Aos membros da banca de defesa desta tese que tão gentilmente aceitaram ler esse trabalho e avaliá-lo.

E por fim, deixo aqui registrado o meu profundo agradecimento aos animais utilizados neste trabalho.

Este trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

CAPELLI-PEIXOTO, J. **Vias de sinalização envolvidas na resposta imunológica do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus***. 2016. 150 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Carrapatos são ectoparasitos hematófagos obrigatórios e vetores de diversas espécies de vírus, protozoários e bactérias que causam importantes enfermidades ao homem e aos animais. No Brasil, o principal carrapato que causa grande prejuízo à pecuária é o *Rhipicephalus microplus*, que é o vetor da bactéria *Anaplasma marginale*, agente etiológico da anaplasmoze bovina. Com os avanços das técnicas moleculares, a complexidade da interface vetor-patógeno vem sendo melhor entendida. Apesar disso, pouco se conhece sobre as defesas imunológicas do *R. microplus* frente ao controle da infecção por *A. marginale*. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo a caracterização molecular e funcional das vias de sinalização celular Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat implicadas na modulação dos genes envolvidos na resposta imune do carrapato *R. microplus*. Através de análises *in silico*, a maioria dos genes das vias de sinalização foi identificada, com exceção dos componentes *upstream* da via Imd (*Imd*, *Fadd*, *Pirk*, *Dnr1* e *Dredd*), assim como a citocina *Upd* da via Jak/Stat. Verificou-se que a infecção das células BME26 por *A. marginale* promoveu uma redução na expressão gênica dos componentes dessas vias, quando comparado com o efeito promovido por outros microrganismos, dentre eles a *Rickettsia rickettsii*. Os genes que codificam os fatores de transcrição Dorsal (Toll), Relish (Imd) e Stat (Jak/Stat) foram silenciados através da técnica de RNA de interferência nos carrapatos *R. microplus* e nas células BME26, com o objetivo de se verificar a importância das vias frente à infecção por *A. marginale*, bem como na regulação dos peptídeos antimicrobianos (PAMs). No carrapato, Relish mostrou ser importante no controle da infecção por *A. marginale*, e este controle foi, possivelmente, via regulação do PAM microplusina. Foi verificado ainda que a expressão de outros três PAMs, ixodidina, defensina e lisozima, está, provavelmente, sob o controle da via Stat. No modelo celular BME26, após o tratamento com as dsRNA dos fatores de transcrição Dorsal, Relish e Stat, não foi observado alteração no número de *A. marginale*. Além disso, foi observado nos modelos *in vivo* e *in vitro*, o silenciamento inespecífico dos genes de alguns fatores de transcrição, o que pode ser devido a um *cross-talk* entre as vias de sinalização. Com este trabalho, ampliamos o conhecimento sobre o sistema imune de carrapatos no sentido de compreender melhor a interface vetor-patógeno, gerando dados que possam servir de base para outros estudos que envolvam estratégias de controle do vetor e da anaplasmoze.

Palavras-chave: Carrapatos. Imunidade inata. Vias de sinalização. *Rhipicephalus microplus*. *Anaplasma marginal*. Peptídeos antimicrobianos.

ABSTRACT

CAPELLI-PEIXOTO, J. **Signaling pathways involved in the immunological response of cattle tick *Rhipicephalus microplus***. 2016. 150 p. Ph. D. Thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Ticks are obligate blood-sucking ectoparasites and vectors of several species of viruses, protozoa, and bacteria, which cause important diseases in humans and animals. In Brazil, the main tick species responsible for economic losses to livestock is *Rhipicephalus microplus*, which is the vector of the bacteria *Anaplasma marginale*, the etiological agent of bovine anaplasmosis. Advances in molecular techniques have gradually unraveled the complexity of the vector-pathogen interface. Nevertheless, little is known about the immune defenses of *R. microplus* against infection with *A. marginale*. In this context, this study aimed to perform molecular and functional characterization of the signaling pathways Toll, Imd, Jnk, and Jak/Stat, which are involved in the modulation of genes associated with the immune response of *R. microplus*. An in silico analysis allowed the identification of several genes of these signaling pathways, except the upstream components of the Imd pathway (*Imd*, *Fadd*, *Pirk*, *Dnr1*, and *Dredd*), and the cytokine Upd from the Jak/Stat pathway. The infection of the tick cell line BME26 with *A. marginale* decreased the expression of components of these pathways compared with the infection with other microorganisms, including *Rickettsia rickettsii*. We silenced the genes encoding the transcription factors Dorsal (Toll), Relish (IMD), and Stat (Jak/Stat) using RNA interference in *R. microplus* and BME26 cells to assess the role of these pathways in bacterial infection and regulation of the expression of antimicrobial peptides (AMPs). In the tick, Relish was essential for the control of bacterial infection, and this control was probably exerted via regulation of the AMP microplusin. We hypothesize that the expression of three other AMPs - ixodidin, defensin, and lysozyme - is under the control of the Stat pathway. However, the number of *A. marginale* did not change significantly in BME26 cells treated with dsRNA of the transcription factors Dorsal, Relish, and Stat. Furthermore, in both the in vivo and in vitro model, we observed the non-specific silencing of some transcription factors, which might be due to the cross-talk between these signaling pathways. This study helped elucidate the role of the immune system of ticks in the vector-pathogen interface, and our results can serve as the basis for the development of strategies for the control of vector species and anaplasmosis.

Keywords: Ticks. Innate immunity. Signaling pathways. *Rhipicephalus microplus*. *Anaplasma marginale*. Antimicrobial peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	22
Figura 2 - Ciclo biológico do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	23
Figura 3 - Esquema ilustrativo do ciclo de desenvolvimento do <i>Anaplasma marginale</i>	26
Figura 4 - Barreiras contra a transmissão de patógenos.....	28
Figura 5 - Representação esquemática das vias de sinalização celular Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat.....	38
Figura 6 - Metodologia utilizada para a injeção dos carrapatos.....	65
Figura 7 - Bezerro infectado com <i>Anaplasma marginale</i> (cepa <i>St. Maries</i>) utilizado nos experimentos de silenciamento gênico dos fatores de transcrição nos carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para os ensaios de PCR, qPCR, RT-qPCR e síntese das dsRNA, acrescidas da sequência promotora T7 (sublinhadas).....	49
---	----

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

PAMs	Peptídeos antimicrobianos
Blast	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Cisteína
cDNA	Ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar
COXIII	Citocromo c oxidase subunidade III
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Ácido Glutâmico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FRePs	<i>Fibrinogen-related proteins</i>
<i>g</i>	Força centrífuga
G	Glicina
GST	Glutathione S transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Imd	<i>Immune deficiency pathway</i>
Jak/Stat	<i>Janus Kinase/signalling transducer and activator of transcription</i>
LB	Meio Lúria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Micromolar
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MP	Membrana peritrófica
O ₂	Oxigênio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGRPs	<i>Peptidoglycan recognition proteins</i>

PMAPs	Padrões moleculares associados a patógenos
Q	Glutamina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
qsp	Quantidade suficiente para
RHD	<i>Rel Homology Domain</i>
rpm	Rotações por minuto
RRPs	Receptores de reconhecimentos de padrões
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa
TEPs	Proteínas contendo tioéster
TIR	<i>Toll interleukin-1 receptor</i>
°C	Graus Celsius
mg/mL	Miligramas por Microlitros
µg	Micrograma
µL	Microlitro
%	Porcentagem
Δ	Delta

SUMÁRIO

1 Introdução	20
1.1 Carrapatos como vetores de doenças infecciosas.....	20
1.2 O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	21
1.2.2 <i>Ciclo biológico</i>	22
1.2.3 <i>Importância econômica</i>	23
1.2.4 <i>Métodos de controle</i>	24
1.3 <i>Anaplasma marginale</i> e Anaplasmoses bovina.....	25
1.3.1 <i>Métodos de controle</i>	27
1.4 O sistema imunológico dos carrapatos.....	27
1.4.1 <i>Resposta imune celular</i>	30
1.4.1.1 <u>Fagocitose</u>	30
1.4.1.2 <u>Encapsulação</u>	30
1.4.1.3 <u>Nodulação</u>	31
1.4.2 <i>Resposta imune humoral</i>	31
1.4.2.1 <u>Moléculas de reconhecimento</u>	31
1.4.2.2 <u>Estresse Oxidativo</u>	32
1.4.2.3 <u>Peptídeos antimicrobianos</u>	34
1.4.3 <i>Vias de sinalização celular</i>	38
1.4.3.1 <u>Via Toll</u>	39
1.4.3.2 <u>Via Imd</u>	39
1.4.3.3 <u>Via Jak/Stat</u>	41
1.5 Interações vetor-patógeno.....	41
2 Objetivos	45
2.1 Objetivo geral.....	45
2.2 Objetivos específicos.....	45
3 Material e Métodos	46
3.1 Análise <i>in silico</i> dos homólogos dos genes envolvidos nas vias de sinalização celular.....	47
3.1.1 <i>Sequências de Dorsal e Cactus</i>	48
3.2 Oligonucleotídeos.....	48

3.3 Material Biológico.....	52
3.3.1 Células embrionárias BME26.....	52
3.3.2 Microrganismos.....	52
3.3.3 Carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>bezerros</i>	52
3.4 Avaliação da expressão gênica dos componentes das vias de sinalização nas células BME26 após diferentes desafios microbianos.....	53
3.4.1 Preparação dos inóculos.....	53
3.4.1.1 <u>Anaplasma marginale</u> (cepa Jaboticabal).....	53
3.4.1.2 <u>Rickettsia rickettsii</u> (cepa Taiaçu).....	54
3.4.1.3 <u>Microrganismos termo-inativados: <i>Micrococcus luteus</i>, <i>Enterobacter cloacae</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	54
3.4.2 Extração de DNA, RNA e síntese de cDNA.....	55
3.4.3 Quantificação do número de bactérias <i>Anaplasma marginale</i> e <i>Rickettsia rickettsii</i> por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	56
3.4.4 Cinética de expressão gênica através de PCR quantitativo (qPCR) em larga escala (Fluidigm).....	56
3.4.4.1 <u>Análise dos dados</u>	57
3.5 Silenciamento genético das células BME26.....	58
3.5.1 PCR convencional e Sequenciamento.....	58
3.5.2 Produção de dsRNA.....	59
3.5.3 Tratamento das células BME26 com as dsRNA.....	59
3.5.4 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	60
3.5.4.1 <u>Curva de eficiência dos oligonucleotídeos</u>	60
3.5.4.2 <u>Avaliação do silenciamento gênico dos fatores de transcrição e análise da expressão gênica dos PAMs</u>	61
3.6 Silenciamento gênico dos fatores de transcrição no carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	61
3.6.1 Colônia de carrapatos e infecção do bezerro com <i>Anaplasma marginale</i> (cepa St. Maries).....	62
3.6.2 Síntese das dsRNA.....	62
3.6.3 Tratamento dos carrapatos com as dsRNA e infecção com <i>Anaplasma marginale</i>	62
3.6.3.1 <u>Avaliação do silenciamento gênico e expressão dos PAMs</u>	63
3.6.4 Avaliação da modulação gênica dos fatores de transcrição e dos PAMs frente à infecção por <i>Anaplasma marginale</i>	64
4 Resultados e Discussão.....	66

4.1 Caracterização molecular e o perfil transcricional após o desafio microbiano dos genes relacionados com as vias de sinalização imunológicas do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	67
4.2 As vias de sinalização do carrapato bovino <i>Rhipicephalus microplus</i> controlam a infecção por <i>Anaplasma marginale</i> nas glândulas salivares.....	69
4.3 Células BME26 como modelo de estudo das vias de sinalização do carrapato bovino <i>Rhipicephalus microplus</i>	70
5 Conclusão	72
Referências	73
Apêndices	86
A - Exploring the immune signaling pathway-related genes of the cattle tick <i>Rhipicephalus microplus</i> : from molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge.....	87
B - Immune signaling pathways regulating <i>Anaplasma marginale</i> infection of the bovine tick <i>Rhipicephalus microplus</i>	101
C - Caracterização funcional das vias de sinalização do sistema imune nas células embrionárias BME26 de <i>Rhipicephalus microplus</i>	127

“Esta tese foi elaborada de acordo com as normas da CPG/ICB relativas a outras formas de elaboração de tese de Doutorado que permite a inclusão, como Anexos de resultados já publicados ou submetidos em periódicos internacionais indexados em língua inglesa. Permite ainda que detalhes metodológicos e resultados obtidos sejam aqueles contidos nos artigos anexados ao corpo da tese”.

Artigos que compõem o corpo da tese:

- Apêndice A** - Exploring the immune signaling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: from molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge.
- Apêndice B** - Immune signaling pathways regulating *Anaplasma marginale* infection of the bovine tick *Rhipicephalus microplus*.
- Apêndice C** - Caracterização funcional das vias de sinalização do sistema imune nas células embrionárias BME26 de *Rhipicephalus microplus*.

1 Introdução

1.1 Carrapatos como vetores de doenças infecciosas

Carrapatos são artrópodes hematófagos obrigatórios que parasitam vertebrados terrestres (mamíferos, aves, répteis e anfíbios) e são encontrados em todas as regiões do globo terrestre incluindo a Antártica (KEIRANS; DURDEN, 2005). Estes ectoparasitos estão distribuídos em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae, de acordo com as diferenças na composição cuticular. A família Ixodidae compreende 702 espécies divididas em 14 gêneros (GUGLIELMONE et al., 2010). Os carrapatos ixodídeos, conhecidos como carrapatos “duros”, são caracterizados por um rígido escudo quitinoso (SONENSHINE, 1991). Os ixodídeos possuem três estádios de desenvolvimento (larva, ninfa e adulto macho ou fêmea) e o ciclo de vida pode envolver um, dois ou três hospedeiros. Os carrapatos desta família alimentam-se por períodos longos, e a fase parasitária é finalizada após o completo ingurgitamento, desprendimento da pele do hospedeiro e oviposição de grande quantidade de ovos, uma única vez (KLOMPEN et al., 2004). Nesta família encontram-se alguns gêneros de importância médica e médico-veterinária, tais como: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* (DANTAS-TORRES et al., 2012).

Na família Argasidae, estão agrupados os carrapatos “moles”, com cobertura dorsal não esclerotizada (SONENSHINE, 1991). Os argasídeos têm uma fase de vida parasitária bastante curta (de minutos a horas) e podem permanecer por longos períodos sem se alimentar. Os estádios de desenvolvimento são larva, de dois a oito estádios de ninfa e adulto macho e fêmea. As fêmeas ovipõem pequenas porções de ovos após cada repasto sanguíneo (KOPACEK et al., 2010). Esta família agrupa 193 espécies distribuídas em cinco gêneros (GUGLIELMONE et al., 2010). Destes, os gêneros *Argas* e *Ornithodoros* são comumente associados a infestações humanas e animais e responsáveis pela disseminação de vírus e de bactérias do gênero *Borrelia* (DANTAS-TORRES et al., 2012).

E por fim, a família Nuttalliellidae que é representada por uma única espécie africana, *Nuttalliella namaqua*, que reúne características comuns das outras duas

famílias, possuindo um pseudo-escudo com somente uma parte esclerotizada (SONENSHINE, 1991). Existem poucos estudos sobre esta família reportados na literatura (HORAK et al., 2012; LATIF et al., 2012; MANS et al., 2011; MANS et al., 2014).

Os carrapatos possuem grande importância como vetores de agentes patogênicos, como vírus, protozoários e bactérias, os quais, por sua vez, podem ocasionar doenças severas no hospedeiro (DE LA FUENTE et al., 2008). Algumas viroses transmitidas por carrapatos podem causar encefalites (como por exemplo Encefalite de Powassan, de Langat e Louping ill) e febres hemorrágicas (Omsk e doença da floresta de Kyasanur), e são ocasionadas por vírus da família Flaviviridae (LASALA; HOLBROOK, 2010). Entretanto, vírus das famílias Bunyaviridae, Reoviridae, Asfaviridae e Orthomyxoviridae também podem ser transmitidos por carrapatos e causar doenças em humanos e animais (DE LA FUENTE et al., 2008). As babesioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Babesia* e estão distribuídas em todos os continentes. A babesiose bovina, causada por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, causa inúmeros prejuízos pecuários (SUAREZ; NOH, 2011). Outros protozoários transmitidos por carrapatos são pertencentes aos gêneros *Theileria*, *Hepatozoon* e *Cytauxzoon* (DE LA FUENTE et al., 2008).

Assim como vírus e protozoários, as bactérias também são importantes agentes infecciosos transmitidos por carrapatos. As bactérias dos gêneros *Francisella* (causadora da tularemia), *Coxiella* (Febre Q), *Borrelia* (Doença de Lyme, entre outras), *Ehrlichia* (erliquiose monocítica canina e erliquiose granulocítica humana), *Rickettsiia* (Febre maculosa) e *Anaplasma* (anaplasmoose granulocítica humana, anaplasmoose bovina, entre outras) (DE LA FUENTE et al., 2008).

1.2 O carrapato *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *R. microplus* (Canestrini, 1887) é um ixodídeo de origem asiática (provavelmente da Índia ou Nepal), mas disseminado para alguns continentes, podendo ser encontrado em rebanhos da Ásia, África, Américas (Central e do Sul) e Oceania (**Figura 1**) (BARRÉ; UILENBERG, 2010). O seu hospedeiro preferencial é o bovino, mas

pode ser encontrado alimentando-se em bubalinos, equídeos, ovinos, cervídeos e caprinos (EVANS et al., 2000; MIRANPURI, 1988; NYANGIWE; HORAK, 2007).

Figura 1 - Distribuição global do carrapato *Rhipicephalus microplus*.



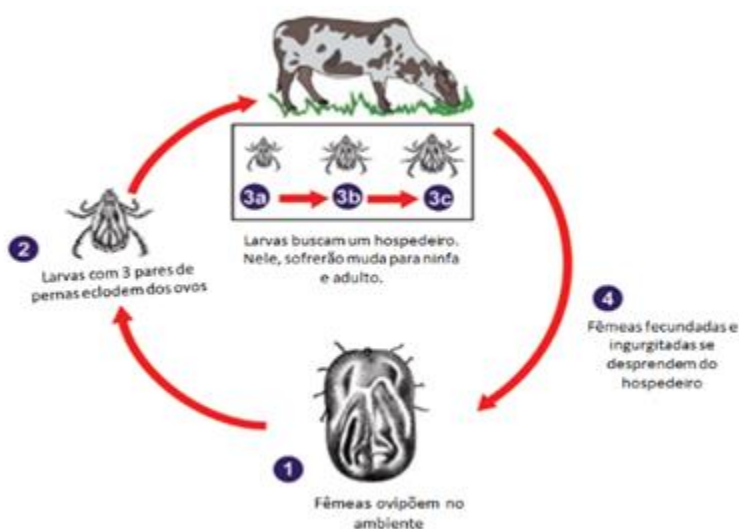
Do sul e sudeste asiático, o carrapato bovino *R. microplus* foi transportado com o gado para a África Oriental, para as Ilhas Comoro, Madagascar e Ilhas Mascarenhas, para a América Latina, para o norte e leste da Austrália, Nova Caledônia e Polinésia Francesa. Fonte: Barré e Uilenberg (2010).

1.2.1 Ciclo biológico

O *R. microplus* é um ectoparasito monóxeno, ou seja, realiza todo seu ciclo de vida em um único hospedeiro. Seu ciclo biológico é dividido em fase de vida livre e fase de vida parasitária e consiste de um estágio inativo (ovos) e três estágios móveis e hematófagos (larva, ninfa e adulto). Como esquematizado na **Figura 2**, após o repasto sanguíneo, a teleógina (fêmea fecundada e ingurgitada) se desprende do hospedeiro, atinge o solo e inicia a oviposição, que pode atingir aproximadamente 3.000 ovos/fêmea. Ao término da postura, a fêmea morre. As larvas eclodem dos ovos, sobem pelas gramíneas e arbustos e ficam à espera da passagem dos hospedeiros, para se fixarem neles e dar início à fase parasitária. Neste estágio, os carrapatos são sexualmente imaturos e têm três pares de pernas. Após a fixação e alimentação no hospedeiro, a larva sofre ecdise para ninfa, também sexualmente imatura, porém com quatro pares de

pernas. A ninfa, por sua vez, se ingurgita, sofre ecdise e ocorre a diferenciação sexual para macho ou fêmea. Depois da cópula e completo ingurgitamento, a fêmea se desprende do hospedeiro caindo ao solo para ovipor, dando continuidade ao ciclo biológico. Os machos permanecem por mais tempo no hospedeiro e podem fecundar diversas fêmeas. A fase de vida parasitária dura em média 21 dias, já a fase de vida livre dura de 28 a 51 dias, podendo se estender a mais de 300 dias (DA SILVA VAZ JUNIOR et al., 2012; GONZALES, 1974).

Figura 2 - Ciclo biológico do carrapato *Rhipicephalus microplus*.



Carrapatos monoxenos permanecem no mesmo hospedeiro nas fases de larva, ninfa e adulto, deixando-o apenas antes da postura dos ovos. 1) As fêmeas desprendem-se do hospedeiro e ovipõem no ambiente. 2) Dos ovos eclodem larvas de seis pernas. 3a – 3c) As larvas procuram um hospedeiro e iniciam alimentação sanguínea. As larvas sofrem muda para ninfas e posteriormente para adultos, machos e fêmeas. Após a cópula e completo ingurgitamento, 4) as fêmeas se desprendem do hospedeiro e depositam seus ovos no ambiente, dando continuidade ao ciclo biológico. Adaptado do *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC (2013).

1.2.2 Importância econômica

O *R. microplus* está amplamente distribuído no Brasil e causa sérios prejuízos a pecuária nacional (LABRUNA; VERISSIMO, 2001). A alta ingestão de sangue, a irritabilidade e as lesões cutâneas causadas pela picada do carrapato durante o repasto sanguíneo refletem em significativas perdas econômicas. Grisi e colaboradores (2014) estimaram que no Brasil, US\$ 3, 236.35 milhões de dólares/ano são perdidos devido à

queda na produção de carne e de leite em rebanhos infestados por carrapatos. Além disso, as lesões produzidas no couro do animal causam cicatrizes irreversíveis e diminuem o seu valor comercial. Outros prejuízos decorrentes da infestação de carrapatos podem ser relacionados à mão-de-obra necessária para o controle do carrapato, a compra de carrapaticidas, instalações e equipamentos adequados para sua aplicação do produto no rebanho, além dos custos com as doenças (anaplasmose e babesiose) que os carrapatos podem causar aos animais (VIDOTTO, 2012).

1.2.3 Métodos de controle

O método de controle do carrapato que mais tem sido utilizado desde a década de 50 é o uso de acaricidas (PRUETT, 1999), que podem ser administrados sob a forma de banho de imersão, aspersão ou “pour on” e atualmente constitui o método mais eficaz de controle do carrapato. No entanto, com o uso prolongado ou indevido, os acaricidas podem selecionar linhagens de carrapatos resistentes (GUERREIRO et al., 2012), além de contaminar o leite, a carne e o ambiente (DE LA FUENTE; KOCAN, 2006).

Outro método de controle é o uso de vacinas baseadas em proteínas do carrapato, como é o caso da Bm86, uma proteína do intestino de *R. microplus*, que induz resposta imunológica em bovinos imunizados e é a base de duas vacinas comerciais, a TickGard^{PLUS}, desenvolvida na Austrália e a GavacTM, desenvolvida em Cuba (DE LA FUENTE et al., 1999). Em um experimento realizado em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, o uso da TickGard^{PLUS} e GavacTM tiveram 46,4% e 49,2% de eficácia contra *R. microplus*, respectivamente (ANDREOTTI, 2006), demonstrando que não asseguram a proteção necessária para suprimir o uso de acaricidas (DA SILVA VAZ JUNIOR et al., 2012).

O controle biológico inclui o cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das fases de vida livre (larvas recém eclodidas) do parasito (FARIAS et al., 1986), a ação de predadores naturais, como formigas, a galinha doméstica e o fungo *Metarhizium anisopliae* que podem ser empregados no controle biológico do carrapato, entretanto, ainda há poucos estudos que avaliam o impacto destes predadores (VERÍSSIMO, 2013) e a rotação de pastagens (RECK, sem data).

1.3 *Anaplasma marginale* e Anaplasmosse bovina

A bactéria *A. marginale* (Theiler, 1909) (Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rickettsiales, Anaplasmataceae) é o agente etiológico da anaplasmosse bovina. No bovino, o *A. marginale* infecta somente os eritrócitos e se localiza em inclusões ligadas à membrana citoplasmática da célula hospedeira. Dependendo da cepa de *A. marginale* e da susceptibilidade do hospedeiro, o *A. marginale* pode invadir de 10 a 90% dos eritrócitos bovinos. Os sinais clínicos da fase aguda da doença, incluem anemia e icterícia resultantes da fagocitose maciça dos eritrócitos infectados através do sistema reticuloendotelial dos bovinos, inapetência e constipação ou, às vezes, ligeira diarreia. Outros sinais podem incluir tristeza, mucosas pálidas, olhos fundos, febre (40 – 41 °C), perda progressiva de peso, letargia, aborto e morte por parada cardíaca (NOVAS, 1982; KOCAN et al., 2003).

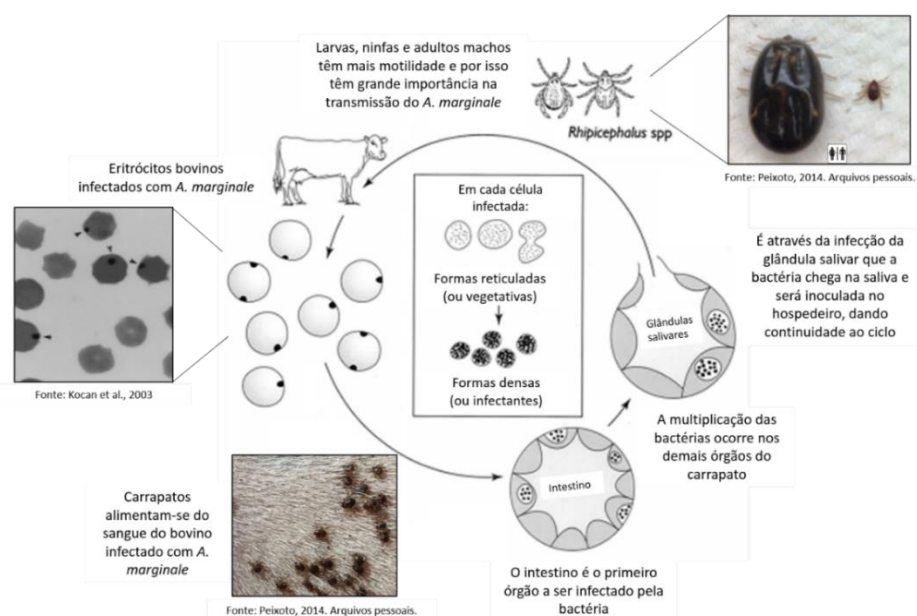
A bactéria *A. marginale* está amplamente distribuída nas regiões subtropicais e tropicais do globo terrestre, nas Américas, sul da Europa, Ásia, África e Austrália. Dezenove espécies de carrapatos já foram incriminadas como vetores biológicos de *A. marginale*, incluindo *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus* spp. e *Ixodes ricinus*, mas em regiões tropicais e subtropicais os carrapatos *R. microplus* e *R. annulatus* são os responsáveis por sua transmissão (KOCAN et al., 2010). A transmissão também pode ocorrer mecanicamente através da picada de insetos hematófagos (do gênero *Tabanus* sp. conhecidas popularmente por “mutucas” e *Stomoxys* sp. conhecidas por “moscas-dos-estábulo”), que carregam resíduos de sangue infectado em suas peças bucais, ou ainda por equipamentos cirúrgicos infectados (tais como agulhas, serra de corte de chifre, instrumentos para tatuagem e instrumentos de castração) (KOCAN et al., 2010).

No carrapato, o ciclo biológico do *A. marginale* é dependente da alimentação sanguínea, uma vez que durante o repasto sanguíneo são adquiridas grandes quantidades de eritrócitos do hospedeiro infectado. Quando os eritrócitos são lisados, ainda no lúmen, as bactérias são liberadas e endocitadas pelas células intestinais do carrapato. No citoplasma das células infectadas, dentro de vacúolos parasitóforos, o desenvolvimento das bactérias se divide em duas fases: 1) forma reticulada ou vegetativa, onde as bactérias se multiplicam por fissão binária formando colônias e 2)

forma densa ou infectante, onde as bactérias saem dos vacúolos, podendo permanecer um curto período de tempo fora das células, e via hemolinfa, migram para outros tecidos, como as glândulas salivares, onde se multiplicam e podem ser transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado na próxima alimentação (KOCAN et al., 2003) (**Figura 3**). A transmissão biológica de *A. marginale* no vetor pode ocorrer de forma interestadial (de um estágio para outro, por exemplo de ninfa para adulto) ou intraestadial (dentro do mesmo estágio) (KOCAN et al., 2000). A transmissão transovariana, ou seja, a passagem da bactéria, através do ovário para a prole, ainda é bastante controversa na literatura científica. Um estudo realizado por Shimada e colaboradores (2004), detectou a presença de DNA de *A. marginale* em larvas mantidas em laboratório a 18 °C ou provenientes do campo. Por outro lado, Esteves e colaboradores (2015) não detectaram a presença do *A. marginale* em ovos e/ou larvas mantidas nas mesmas temperaturas (18 e 28 °C).

Apesar do *R. microplus* ser um ectoparasito monoxeno, larvas, ninfas e machos frequentemente migram de um bovino para outro, devido ao hábito gregário do hospedeiro, com frequentes contatos de animais em fase de cópula ou bezerros e mães em fase de amamentação, disseminando a bactéria para diversos hospedeiros (KESSLER, 2001; MASON; NORVAL, 1981).

Figura 3 - Esquema ilustrativo do ciclo de desenvolvimento do *Anaplasma marginale*.



Os eritrócitos bovinos infectados pela bactéria são ingeridos pelos carrapatos durante o repasto sanguíneo. No lúmen intestinal, ocorrer a lise dos eritrócitos e a liberação das bactérias *A. marginale*, que serão endocitadas pelas células intestinais. Em vacúolos, as bactérias se multiplicam por fissão binária e as colônias passam da forma reticulada para a forma infectante, de acordo com o número de bactérias presentes no vacúolo. Uma vez que as bactérias saem das células intestinais, via hemolinfa, elas chegam aos demais órgãos do carrapato, e ao atingirem as glândulas salivares, podem ser transmitidas ao hospedeiro vertebrado, dando continuidade ao ciclo biológico. Adaptado de Kocan e colaboradores (2003).

1.3.1 Métodos de controle

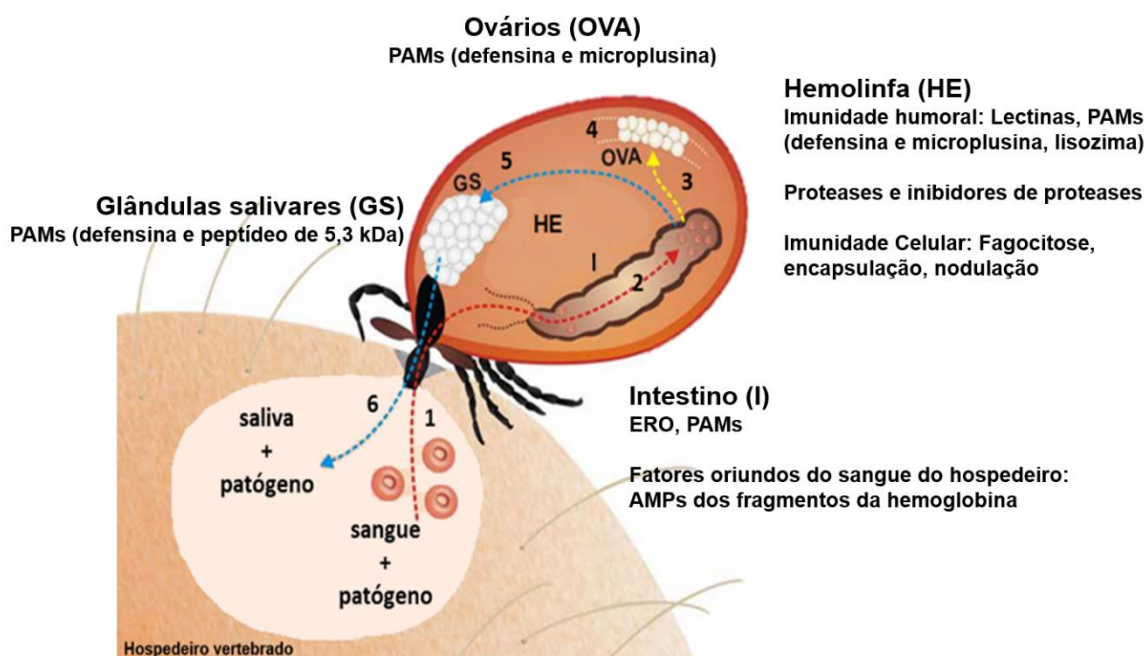
As medidas de controle da anaplasmose bovina incluem além do controle dos vetores, a quimioprofilaxia e a vacinação. A quimioprofilaxia consiste na utilização preventiva de doses subterapêuticas de antimicrobianos nos animais, para evitar a doença clínica. Nas zonas de ocorrência de anaplasmose nos Estados Unidos da América é frequente a quimioprofilaxia com uso de clorotetraciclina adicionada à ração dos animais. No Brasil, o uso de antimicrobianos na ração não é empregado, contudo é comum o uso preventivo dos antibióticos oxitetraciclina e dipropionato de imidocarb injetáveis (RIBEIRO et al., 2003; SACCO, 2002). A vacinação contra *A. marginale* é empregada em rebanhos de vários países africanos, da América do Sul e do Oriente Médio, a vacina consiste na injeção de uma cepa menos virulenta de *Anaplasma*, o *A. centrale* induzindo imunidade protetora contra *A. marginale*. A vacinação resulta em sintomas clínicos leves da doença. A produção desta vacina envolve infectar bovinos esplenectomizados com *A. centrale*, posteriormente coletar grandes volumes de sangue com um nível adequado de bactérias e inocular este sangue nos bovinos como agente vacinal. Esta metodologia de produção do imunógeno *A. centrale* pode possibilitar a transmissão de outros agentes patogênicos de ruminantes (SACCO et al., 2001; VIDOTTO et al., 1998).

1.4 O sistema imunológico dos carrapatos

Como já mencionado anteriormente, durante a alimentação sanguínea, os carrapatos podem adquirir agentes patogênicos presentes no sangue do hospedeiro vertebrado e podem se tornar vetores eficientes deste microrganismo (KOCAN et al., 2010). A habilidade dos patógenos em sobreviver aos mecanismos de defesa imunitária do carrapato, com diversas respostas celulares e humorais em diferentes tecidos é

essencial para a sua sobrevivência (HAJDUSEK et al., 2013). A **Figura 4** é uma representação dos mecanismos e moléculas do sistema imunológico dos carrapatos que constituem potenciais barreiras para a transmissão de patógenos.

Figura 4 - Barreiras contra a transmissão de patógenos.



Em 1) O patógeno é adquirido juntamente com a refeição sanguínea. 2) O patógeno interage com fatores do intestino do carrapato, como espécies reativas de oxigênio (ERO) e peptídeos antimicrobianos (PAMs). 3) Após atravessar o epitélio intestinal, o patógeno chega à hemocele, onde interage com os fatores da hemolinfa da imunidade celular e humoral. 4) Alguns patógenos podem invadir os ovários e serem transmitidos transovarianamente. 5) As glândulas salivares são colonizadas e o patógeno interage com fatores das glândulas (PAMs) e com a saliva. 6) Juntamente com a saliva, o patógeno é inoculado no hospedeiro vertebrado. Modificado de Hajdusek e colaboradores (2013).

Como esquematizado na **Figura 4**, o intestino é o primeiro sítio de interação carrapato-patógeno. Diferente dos mosquitos e outros insetos hematófagos, os microrganismos ingeridos pelos carrapatos não entram em contato com proteases digestivas secretadas no lúmen, uma vez que a digestão da hemoglobina e outras proteínas do sangue, ocorre intracelularmente, em células digestivas intestinais (HAJDUSEK et al., 2013; SONENSHINE, 1991). No intestino, diversos mecanismos de defesa celular e humoral do sistema imune do carrapato são ativados em resposta à presença de microrganismos. Portanto, as habilidades para escapar das respostas

imunológicas do vetor são cruciais para a sua multiplicação e transmissão do patógeno (via saliva através das glândulas salivares e/ou ovários).

A hemolinfa (composta de plasma e células circulantes, os hemócitos) também possui diversos mecanismos imunológicos capazes de controlar a disseminação de microrganismos, através de moléculas efetoras e respostas celulares (HAJDUSEK et al., 2013). Na hemolinfa dos carrapatos são encontrados quatro tipos celulares: os pró-hemócitos, plasmatócitos não granulares, granulócitos (subdivididos em I e II) e esferulócitos (SONENSHINE; HYNES, 2008).

No carrapato bovino *R. microplus*, células das glândulas salivares contém acetilcolinesterase, proteases, leucino aminopeptidases, fosfatases alcalinas e ácidas (SONENSHINE, 1991). Os produtos secretados pelas glândulas através da saliva, são anestésicos, anticoagulantes e antiplaquetários (RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003) que atuam bloqueando as defesas do hospedeiro vertebrado contra a fixação e alimentação dos carrapatos. As glândulas salivares, bem como o intestino, são de extrema importância sob o ponto de vista da interação carrapato-patógeno, pois é através das glândulas salivares (via saliva), que os carrapatos transmitem os microrganismos aos hospedeiros vertebrados (HAJDUSEK et al., 2013).

O ovário também tem um importante papel na interface carrapato-patógeno, já que está associado à transmissão de microrganismos, como o protozoário *B. bovis* que é transmitido transovarianamente à prole de *R. microplus* (HOWELL et al., 2007).

Molecularmente, o sistema imunológico dos carrapatos é ativado mediante o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos - PMAPs (ou PAMPs - *Pathogen-associated molecular pattern*) por receptores de reconhecimento de padrões ou RRP (ou PRRs - *Pattern Recognition Receptors*) presentes na hemolinfa, corpo gorduroso e outros tecidos do carrapato. Os PMAPs podem ser de vários tipos: peptídeos contendo N-formil metilmetionina de origem bacteriana, flagelos bacterianos, ilhas de CpG presentes no DNA bacteriano, lipopolissacarídeos (LPS), ácidos teicóicos e peptidoglicanos de bactérias, zimosan de fungos e outros componentes específicos da membrana de parasitos (GORDON, 2002; SONENSHINE; HYNES, 2008).

A resposta imunológica dos invertebrados consiste em reações celulares e humorais, como fagocitose, encapsulação, nodulação, produção de espécies reativas de

oxigênio (ERO), moléculas de reconhecimento e de peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Figura 4) (HAJDUSEK et al., 2013; KOPACEK et al., 2010; SMITH; PAL, 2014; SONENSHINE; HYNES, 2008). Apenas para facilitar o entendimento, as imunidades celular e humoral foram divididas de forma arbitrária, já que na maioria das vezes as imunidades celular e humoral estão interligadas: fatores humorais podem atuar como moléculas de reconhecimento, facilitando a fagocitose pelas células fagocíticas ou células que podem sintetizar e secretar moléculas humorais como os peptídeos antimicrobianos.

1.4.1 Resposta imune celular

1.4.1.1 Fagocitose

A fagocitose é um processo exercido por células que reconhecem e englobam os microorganismos, através da emissão de pseudopodes, destruindo os invasores ou partículas estranhas (não-próprio). No carrapato *Ornithodoros moubata*, foi demonstrado o processo de fagocitose, sendo realizado pelos plasmatócitos e granulócitos circulantes, após a inoculação na hemocele de esferas de poliestireno fluorescentes e da bactéria Gram-negativa *Chryseobacterium indologenes* (BURESOVA et al., 2006; INOUE et al., 2001). Na hemolinfa do carrapato *R. microplus* foram detectados dois tipos de hemócitos, denominados plasmatócitos e granulócitos, sendo que os primeiros estão envolvidos com o processo de fagocitose (PEREIRA et al., 2001).

1.4.1.2 Encapsulação

Organismos invasores grandes para serem destruídos por fagocitose ou nodulação, tais como parasitóides e nemátodes, podem ser eliminados por encapsulação, na presença de melanina. A melanização e a produção de radicais livres tóxicos, matam o organismo invasor por asfixia (ROYET et al., 2003). O processo de encapsulação foi demonstrado utilizando fragmentos de resina Epon-araldite implantados sob a cutícula de *Dermacentor variabilis*. Este estudo mostrou o

envolvimento dos plasmatócitos e granulócitos do tipo I e II na formação gradual de uma cápsula de múltiplas camadas celulares em volta do implante (EGGENBERGER et al., 1990 citado por KOPACEK et al., 2010).

1.4.1.3 Nodulação

O processo de nodulação é semelhante ao encapsulamento, porém sem a presença de melanina (CERAUL et al., 2002). Em carrapatos, os hemócitos que reconhecem componentes das superfícies bacteriana (tais como LPS, por exemplo), podem responder por nodulação, que é a agregação celular em torno das bactérias, resultando no aprisionamento dos organismos invasores. Moléculas opsonizantes, como as lectinas, também participam deste processo. A lectina Dorin-M foi isolada a partir de hemócitos de *O. moubata* (KOVAR et al., 2000), enquanto que a Ixoderin A foi encontrada nos hemócitos e intestino de *I. ricinus* (REGO et al., 2005). O processo de nodulação foi demonstrado em estudos realizados com o carrapato *D. variabilis*, que após a inoculação de uma quantidade exacerbada de *Escherichia coli* na hemocele, observou-se diversos agregados de bactérias mortas envoltos por massa de tecido provavelmente de origem celular, no local da inoculação (CERAUL et al., 2002).

1.4.2 Resposta imune humoral

O reconhecimento da invasão de microrganismos induz a expressão de moléculas que atuam diretamente sobre o invasor. Estas moléculas da resposta imune humoral incluem moléculas de reconhecimento, como as lectinas e proteínas contendo tioéster (TEPs), proteases, inibidores de proteases, espécies reativas de oxigênio (ERO) e peptídeos antimicrobianos (PAMs) (SONENSHINE; HYNES, 2008).

1.4.2.1 Moléculas de reconhecimento

As lectinas (ou aglutininas) são proteínas com capacidade de se ligar aos carboidratos encontrados na superfície bacteriana, de leveduras e protozoários. Após o

reconhecimento, as lectinas opsonizam o microrganismo invasor de forma que os hemócitos circulantes possam destruí-lo por fagocitose, encapsulação ou nodulação. Nos carrapatos, as lectinas foram identificadas no plasma, hemócitos, glândulas salivares, intestino e túbulos de Malpighi (SONENSHINE; HYNES, 2008). A lectina Dorin M, inicialmente isolada no plasma do carrapato *O. moubata*, pertence a uma família de proteínas com domínio do tipo fibrinogênio ou Freps (*Fibrinogen-related proteins*) que reconhece sequências de carboidratos, especialmente o ácido siálico e N-acetil-D-glucosamina, e por isso podem reconhecer uma vasta gama de bactérias Gram-negativas (KOVAR et al., 2000; REGO et al., 2006). Outras lectinas, OmFREP (de *O. moubata*) e ixoderinas A e B (de *I. ricinus*) foram identificadas em hemócitos, glândula salivar e intestino. As ixoderina A e B, assim como Dorin M e OmFREP, têm um domínio de fibrinogênio semelhante às ficolinas de mamíferos (REGO et al., 2005).

As proteínas contendo tio-éster ou Teps (*Thioester-containing proteins*) encontradas em carrapatos, tais como proteínas do sistema complemento-like (componente C3 do sistema complemento) e as α_2 -macroglobulinas (α_2 M) desempenham um importante papel no sistema imune ao se ligar covalentemente à superfície de microrganismos, promovendo sua opsonização e deixando-os acessíveis aos hemócitos (URBANOVÁ et al., 2015). O sítio tioéster destas proteínas é definido pela sequência aminoacídica CGEQ (AOUN et al., 2010). Experimentos envolvendo RNAi revelaram que a fagocitose de *C. indologenes* pelos hemócitos do carrapato *I. ricinus* é mediada pelas moléculas de reconhecimento α_2 M (BURESOVA et al., 2009) e a fagocitose de *Candida albicans* é mediada por Teps do sistema complemento-like (URBANOVÁ et al., 2015). As Teps são expressas nos hemócitos, corpo gorduroso e glândulas salivares, além de terem sido encontradas em ovos fertilizados e larvas do carrapato *I. ricinus*, sugerindo que estas moléculas podem desempenhar um papel no desenvolvimento inicial dos carrapatos (URBANOVÁ et al., 2015).

1.4.2.2 Estresse Oxidativo

Durante a digestão sanguínea, no intestino dos carrapatos e de invertebrados hematófagos, são produzidas espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas

de nitrogênio (ERN). O desbalanço entre a produção de ERO/ERN e remoção pelo sistema antioxidante é denominado estresse oxidativo. Para proteger as células epiteliais contra os efeitos nocivos das ERO/ERN, enzimas como a catalase e as peroxirredoxinas funcionam como antioxidantes e são reguladas para minimizar a toxicidade celular (SONENSHINE; HYNES, 2008).

Pereira e colaboradores (2001) avaliaram a produção de ERO por hemócitos de *R. microplus* quando estimulados por *Micrococcus luteus* e *Saccharomyces cerevisiae* e constataram que as células produzem H_2O_2 e O_2 . Analisando os efeitos da infecção por *A. marginale* sobre genes envolvidos no controle do estresse oxidativo, em células embrionárias do carrapato *R. microplus* (BME26) observou-se que a expressão dos genes que codificam enzimas oxidantes (óxido nítrico sintase, oxidase do retículo endoplasmático e dual oxidase) foram reprimidos enquanto os genes codificadores de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase (GST) e tioredoxina) foram induzidos. Por outro lado, o perfil da modulação dos genes oxidantes e antioxidantes durante a infecção pela bactéria *R. rickettsii* (bactéria que não é transmitida por *R. microplus*), foi o contrário do observado com *A. marginale*, com genes oxidantes induzidos e antioxidantes reprimidos (KALIL-PERDOMO et al., em preparação).

No carrapato *D. variabilis*, o gene da GST foi induzido em diferentes tecidos após infecção por *Rickettsia montanensis* (MULENGA et al., 2003) e após alimentação sanguínea (DREHER-LESNICK et al., 2006). Da mesma forma, a alimentação sanguínea também ocasionou a indução do gene GST no intestino e glândulas salivares de *R. microplus* (ROSA DE LIMA et al., 2002). A proteína da glândula salivar de *I. scapularis*, Salp25D é regulada positivamente após a alimentação sanguínea e seu silenciamento prejudica a aquisição de *B. burgdorferi* pelos carrapatos. Acredita-se que a Salp25D tenha a função homóloga da glutathione peroxidase e funcione como um antioxidante, sendo importante para neutralizar as espécies reativas de oxigênio liberadas dos neutrófilos ativados, protegendo as bactérias durante a aquisição e colonização do intestino carrapato (NARASIMHAN et al., 2007).

1.4.2.3 Peptídeos antimicrobianos

Os PAMs têm um papel importante na resposta imune porque agem rápido e diretamente contra os patógenos invasores. São moléculas de pequena massa molecular (<10k Da), catiônicas e anfipáticas. A carga positiva do peptídeo facilita sua interação com a carga negativa dos constituintes da superfície dos microrganismos e os aminoácidos hidrofóbicos facilitam sua inserção na membrana celular, promovendo sua ruptura (BULET et al., 2004).

Diferentes PAMs foram identificados e caracterizados em vários carrapatos, como por exemplo, as defensinas, microplusina, ixodidina, peptídeo de 5,3k Da, lisozima e fragmentos da hemoglobina (Revisado por KOPACEK et al., 2010; e SONENSHINE; HYNES, 2008). As defensinas são peptídeos catiônicos que contêm seis resíduos de cisteína envolvidos em três pontes dissulfeto (BULET et al., 1999). Em hemócitos do carrapato *R. microplus* foi isolada uma defensina com atividade contra bactérias Gram-positivas (FOGAÇA et al., 2004). Na hemolinfa do carrapato *D. variabilis*, foi identificada uma defensina que é regulada positivamente em resposta ao desafio por *Borrelia burgdorferi*, culminando com a lise da bactéria. Entretanto, a defensina mostrou-se mais efetiva contra o patógeno quando combinada com a lisozima, eliminando 65% da espiroqueta em cultura em menos de 1 hora, sugerindo uma atividade sinérgica dos dois PAMs (JOHNS et al., 2001a).

A varisina é uma defensina de 4,2k Da que foi isolada da hemolinfa de *D. variabilis* e mostrou atividade contra a bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* (JOHNS et al., 2001b). Além disso, experimentos funcionais mostraram que o silenciamento da varisina em *D. variabilis* machos ocasiona uma redução no número de bactérias *A. marginale* (cepa Virginia) nos intestinos e nas glândulas salivares dos carrapatos silenciados quando comparados ao grupo controle. Este resultado, diferente da hipótese inicial criada pelos autores, de que o silenciamento deste PAM ocasionaria um aumento no número de bactérias, pode ser devido a manipulação da expressão da varisina pela bactéria, por mecanismos ainda não definidos, para ajudar na sua multiplicação (KOCAN et al., 2008).

A longicina é uma defensina identificada no intestino de *Haemaphysalis*

longicornis (TSUJI et al., 2007) e sua forma recombinante apresentou atividade antimicrobiana e antifúngica. O silenciamento do gene codificante da longicina fez com que o número de *Babesia gibsoni* aumentasse no intestino, ovários e ovos de *H. longicornis* (TSUJI; FUJISAKI, 2007). Além disso, a longicina tem atividade contra *B. bigemina*, mas não contra *B. bovis* e sua ação foi demonstrada através da inibição da proliferação dos merozoítos *in vitro* (GALAY et al., 2012). Em experimentos *in vivo*, a inoculação de longicina em camundongos infectados por *Babesia microti*, ocasionou a redução significativa da parasitemia (TSUJI et al., 2007).

Outra classe de PAMs, a microplusina, foi isolada da hemolinfa de *R. microplus* e é formada por 90 aminoácidos, dentre eles seis resíduos de cisteína e suas extremidades N- e C-terminal são ricas em resíduos de histidinas (FOGAÇA et al., 2004). Sua atividade antimicrobiana está relacionada com sua habilidade de quelar cobre e ferro e devido ao sequestro dos íons cobre do meio, além do efeito bacteriostático observado contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus*, devido ao comprometimento do processo respiratório bacteriano (SILVA et al., 2009). Similar à microplusina, a hebraína foi isolada da hemolinfa de *Amblyomma hebraeum*, é formada por 102 aminoácidos, possui seis resíduos de cisteínas e a extremidade C-terminal também rica em resíduos de histidina. A hebraína tem atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, a Gram-negativa *E. coli* e a levedura *Candida glabrato* (LAI et al., 2004). Estudos envolvendo carrapatos, mostram que o gene da hebraína foi induzido frente à infecção por *R. rickettsii* em glândulas salivares de fêmeas de *A. aureolatum* e de *A. cajennense* infectadas pela bactéria, por este motivo, o gene da hebraína foi selecionado para experimentos funcionais, através da avaliação dos efeitos de seu silenciamento na aquisição de *R. rickettsii*. Os resultados mostraram que um número maior de carrapatos *A. aureolatum* adquiriu a bactéria em decorrência do silenciamento da hebraína em relação ao controle. Além disso, o número de bactérias nas glândulas salivares e intestinos também foi maior que o controle. Ao contrário do observado para *A. aureolatum*, o silenciamento gênico da hebraína não teve nenhum efeito na aquisição de *R. rickettsii* nos carrapatos *A. cajennense*, reforçando a hipótese de que as respostas dessas duas espécies de carrapato frente à infecção são diferentes (MARTINS et al., manuscrito em preparação).

Outro PAM rico em cisteínas, denominado ixodidina foi isolado dos hemócitos de *R. microplus* e possui dez cisteínas que formam cinco pontes dissulfureto internas. Este peptídeo apresenta atividade contra *E. coli* e *M. luteus*, e também atividade inibitória de duas serina proteinases, elastase e quimiotripsina, podendo estar envolvido no controle das cascatas proteolíticas do sistema imune de artrópodes (FOGAÇA et al., 2006). As proteases são importantes fatores de virulência utilizadas por microrganismos, durante o processo de infecção. Os inibidores de proteases, apesar de não serem diretamente antimicrobianos, são produzidos para inibir seletivamente as proteases dos agentes patogênicos (ARMSTRONG, 2001).

O IsAMP é um PAM de 5.3k Da, com seis resíduos de cisteína que foi isolado da saliva de *I. scapularis* e tem atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas, como *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* e *Bacillus cereus*. Além das glândulas salivares, o IsAMP é expresso em hemócitos e no corpo gorduroso (PICHU et al., 2009). Quando o peptídeo de 5.3k Da foi silenciado, no carrapato *I. scapularis*, ocorreu o aumento no número de bactérias *Anaplasma phagocytophilum*, demonstrando sua importância para o controle bacteriano. Ainda foi demonstrado que a via de sinalização Jak/Stat regula a expressão deste PAM. Quando o fator de transcrição (Stat) foi silenciado, ocorreu a diminuição da expressão do gene do PAM de 5.3k Da em relação ao grupo controle, além do aumento no número de bactérias nas glândulas salivares, intestino e hemolinfa, demonstrando que a via Jak/Stat desempenha um papel crítico na defesa contra *A. phagocytophilum* (LIU et al., 2012).

O PAM Dae2, limita a infecção de *B. burgdorferi* no carrapato *I. scapularis* (CHOU et al., 2015). A expressão deste PAM é regulada pela via de sinalização Jak/Stat, que é ativada pela citocina INF oriunda do sangue do hospedeiro vertebrado infectado com *B. burgdorferi* (SMITH et al., 2016). Um fato superinteressante é que o gene Dae é um gene originalmente de procariontes, e foi transferido aos carrapatos através da transferência horizontal de genes. Esta transferência, comum em bactérias, permite que características adaptativas sejam rapidamente disseminadas entre os organismos e os genes Dae estão sendo preservados nos eucariotes por centenas de milhões de anos (CHOU et al., 2015). O PAM DAe2 está presente no intestino e nas glândulas salivares de *I. scapularis*, e além de ter ação anti-*Borrelia*, é ativo contra *E. coli* (CHOU et al.,

2015).

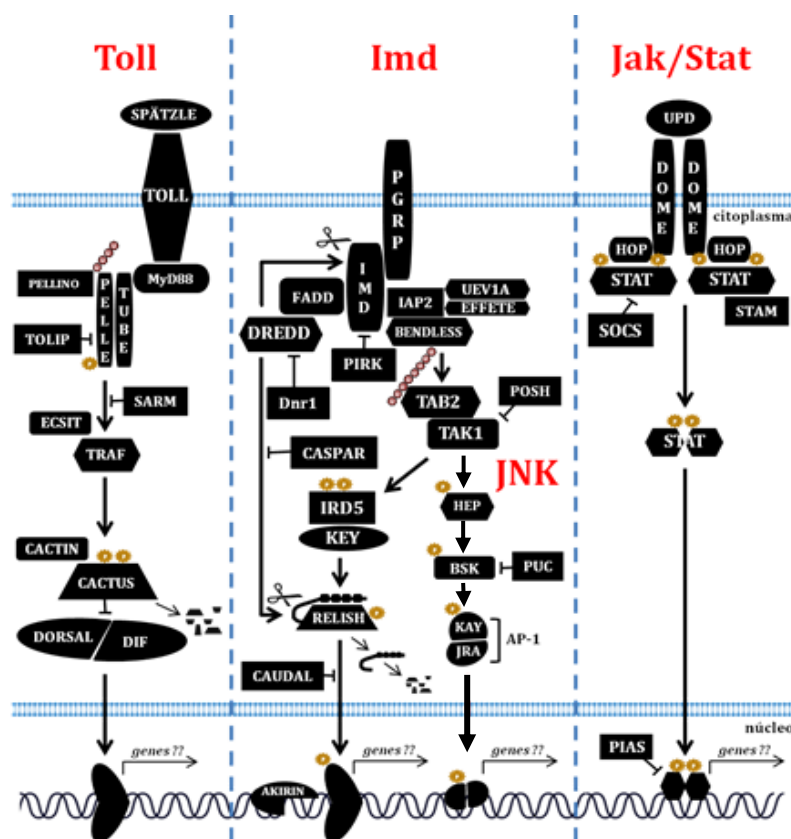
A lisozima é uma pequena proteína (de aproximadamente 14k Da) que pode servir como enzima digestiva, mas também com atividade antimicrobiana contra uma gama de diferentes microrganismos. Seu modo de ação é através da hidrólise das ligações entre o ácido-N-acetilmurâmico e os resíduos de N-acetilglicosamina, que constituem os peptidoglicanos, resultando no rompimento da integridade da parede celular (SONENSHINE; HYNES, 2008). Em *O. moubata* foi caracterizada uma lisozima com atividade anti-*M. luteus* (KOPACEK et al., 1999) e o seu nível de expressão aumentou após a alimentação sanguínea (GRUNCLOVA et al., 2003). No carrapato *D. variabilis* também foi verificado que uma lisozima é expressa no intestino e embora o nível de transcrição deste gene não tenha aumentado após a alimentação sanguínea, sua expressão foi aumentada em carrapatos infectados com *R. montanensis* (CERAUL et al., 2007). Nas linhagens celulares IDE12 (*I. scapularis*) e DAE15 (*D. andersoni*) a expressão da lisozima foi induzida em resposta ao desafio com *M. luteus* e *E. coli*, em ambas as linhagens (MATTILA et al., 2007).

A digestão da hemoglobina, proveniente da alimentação sanguínea do carrapato, é uma importante fonte de produção de PAMs. No intestino do carrapato, a hemoglobina do sangue do hospedeiro sofre proteólise e gera hemocidinas (FOGACA et al., 1999; NAKAJIMA et al., 2003; SONENSHINE et al., 2005) que podem constituir um componente importante da imunidade inata neste órgão (KOPACEK et al., 2010). No intestino de *R. microplus*, foram identificados alguns fragmentos de hemoglobina com atividade antimicrobiana, sendo um deles correspondente aos aminoácidos 33 a 61 da subunidade α da hemoglobina bovina, denominado de Hb 33-61, que é ativo contra bactérias Gram-positivas e fungos e (FOGAÇA et al., 1999; MACHADO et al., 2007; SFORCA et al., 2005) e outros três peptídeos Hb 40-63, Hb 34-63 e Hb 98-114 com atividade antifúngica (BELMONTE et al., 2012; CRUZ et al., 2010). Outras hemocidinas foram isoladas do lúmen intestinal de *O. moubata* e de *D. variabilis* e estes peptídeos apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas (NAKAJIMA et al., 2003; SONENSHINE et al., 2005).

1.4.3 Vias de sinalização celular

Em insetos, o reconhecimento de microrganismos invasores pode ativar diferentes vias de sinalização celular envolvidas na resposta imunológica: Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat (**Figura 5**), as quais induzem a expressão de PAMs e de genes de moléculas efetoras do sistema imune. O conhecimento a respeito da ativação do sistema imunológico em carrapatos ainda é muito pequeno, quando comparado ao de insetos. Por este motivo, a descrição das vias de sinalização abordadas neste item serão baseadas no conhecimento que se tem em insetos.

Figura 5 - Representação esquemática das vias de sinalização celular Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat que controlam a expressão de genes relacionados às respostas imunológicas em *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Adaptado de Rosa e colaboradores (2016).

1.4.3.1 Via Toll

Em *D. melanogaster*, a infecção por bactérias Gram-positivas ou fungos, desencadeia a ativação da via Toll. Como representado na **Figura 5**, depois de ser reconhecido pela proteína extracelular spatzle (que sofreu clivagem proteolítica induzida por uma cascata de cisteino-proteinases (HOFFMANN; REICHHART, 2002) no meio extracelular), ocorre a ligação da spatzle ao domínio extracelular do receptor transmembranar Toll. O receptor Toll, por sua vez, sofre alterações conformacionais resultando no recrutamento da proteína adaptadora MyD88 através de seu domínio TIR (*Toll interleukin-1 receptor*). Após essa interação, Tube e Pelle são recrutados para formar o complexo MyD88-Tube-Pelle. A partir da formação deste complexo, ocorre a fosforilação e a degradação do inibidor Cactus, que em condições de homeostase, está ligado aos fatores de transcrição NF- κ B Dorsal e Dif no citoplasma, impedindo sua entrada no núcleo. Após a degradação de Cactus, Dif é translocado para o núcleo e promove a transcrição dos PAMs defensina, drosomicina e metchnikovina (LECLERC; REICHHART, 2004; VALANNE et al., 2011). O fator de transcrição Dorsal está ligado com a segmentação dorso-ventral do embrião (HETRU; HOFFMANN, 2009). Em outros invertebrados, não é relatada a existência de Dif e Dorsal é o fator de transcrição NF- κ B que promove a transcrição dos PAMs.

Em mosquitos *Aedes aegypti*, a via Toll participa da defesa contra a infecção viral de DENV. Após o silenciamento de Cactus, a infecção pelo vírus é reduzida em até 4 vezes. Por outro lado, o silenciamento de MyD88, faz com que a infecção pelo vírus aumente (XI et al., 2008).

1.4.3.2 Vias Imd e Jnk

Em *D. melanogaster*, a resposta à infecção por bactérias Gram-negativas é controlada pela via Imd, que é iniciada pelo reconhecimento de peptidoglicano contendo ácido diaminopimélico (DAP-type), encontrado na parede celular destas bactérias. Como esquematizado na **Figura 5**, os peptidoglicanos são reconhecidas por proteínas de reconhecimento (PGRPs) que interagem com a proteína intracelular Imd que, ao se complexar com a proteína Fadd, ativa a caspase Dredd. Este complexo induz a

associação da proteína Imd com o complexo de ubiquitinação formado por Iap2, Bendless, Effete e Uev1a e resulta na ativação de Tak1 e Tab2. A ativação do complexo Tak1/Tab2 pode levar tanto à ativação da via Jnk quanto à via de degradação da porção inibitória de Relish, que tem a função de mantê-lo no citoplasma. Após as quinases Ird5 e Key fosforilarem Relish, a caspase Dredd cliva Relish liberando sua região N-terminal que contém um domínio RHD (*Rel homology domain*). Ao ser translocado para o núcleo, este fator é responsável pela transcrição dos PAMs diptericina, cecropina e atacina (LECLERC; REICHHART, 2004; MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009). Caspar é um supressor da via Imd e mantém Relish no citoplasma, impedindo que Dredd clive o fator de transcrição em condições de homeostasia. Caudal é outro regulador negativo da expressão de PAMs que atua no intestino de *D. melanogaster*, evitando a ativação da via pela presença de bactérias comensais (RYU et al., 2008).

A ativação da via Jnk, através do complexo Tak1/Tab2 citado anteriormente, leva à fosforilação de Hemipterous (Hep), que então fosforila Basket (Bsk). Essa última é então responsável pela ativação dos fatores de transcrição Jra e Kay. Puc é o regulador negativo da via. Aparentemente, esta via não induz a transcrição de genes de PAMs, mas parece desempenhar um papel importante na resposta ao estresse oxidativo, promovendo a expressão de genes citoprotetores (BITEAU et al., 2011). Em *A. gambiae*, a supressão desta via, através do silenciamento de Hep, Jra ou Kay fez com que a infecção por *Plasmodium falciparum* aumentasse. Além disso, a Jnk induz a expressão de duas enzimas NOX5 (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - NADPH oxidase 5*) e HPx2 (*heme peroxidase 2*) que potencializam a nitração em resposta contra oocistos de *P. falciparum* no intestino médio do mosquito e ainda regula a expressão de dois efetores imunes, TEP e FBN9 (*Fibrinogen-related protein 9*), cujas proteínas estão envolvidas na opsonização de microrganismos (GARVER et al., 2013). No mosquito *A. gambiae*, a via JNK também regula a expressão do OXR1 (*Oxidation Resistance 1*) que, por sua vez, regula a expressão de enzimas que destoxificam ERO. Quando o gene do OXR1 foi silenciado, ocorreu a diminuição da infecção por *P. falciparum* (JARAMILLO-GUTIERREZ et al., 2010).

1.4.3.3 Via Jak/Stat

Em *D. melanogaster*, a via Jak/Stat pode ser induzida por injúria séptica, que promove a ligação da citocina Unpaired (Upd) ao receptor Domeless (Dome), como esquematizado na **Figura 5**. Essa ligação leva à dimerização desse receptor que fosforila a Jak tirosina quinase Hopscotch (Hop). A fosforilação de Hop cria um sítio de ligação para o fator de transcrição Stat, que ao ser fosforilado, dimeriza com outro Stat e é translocado para o núcleo para ativar a transcrição de genes relacionados ao sistema imunológico. Os inibidores desta via são o Socs e Pias. Socs pode se ligar às Jaks, bloqueando seus sítios catalíticos ou ao receptor Dome e inibir fisicamente a interação de Stat. Pias se liga ao Stat fosforilado e impede sua interação com o DNA. A via Jak/Stat regula a expressão de TEP1 (AGAISSE et al., 2003). Em *A. gambiae*, após silenciamento gênico de Stat e infecções *in vitro* e *in vivo* pelos protozoários *Plasmodium berghei* e *Plasmodium falciparum*, os oocistos de *Plasmodium* aumentaram significativamente, sugerindo que esta via é importante no controle do protozoário. Além disso, em *A. gambiae*, a via Jak/Stat regula a expressão de Tep e NOS (GUPTA et al., 2009). No mosquito *A. aegypti*, após a infecção pelo vírus DENV2, a via Jak/Stat foi ativada e o silenciamento de Pias, fez com que a infecção pelo vírus diminuísse (SOUZA-NETO et al., 2009).

1.5 Interações vetor-patógeno

Como mencionado anteriormente, durante o repasto sanguíneo, o sangue do hospedeiro é processado no intestino do carrapato para a aquisição de nutrientes e geração de energia, utilizada, por exemplo, para a produção de ovos pelas fêmeas. Caso o sangue ingerido contenha microrganismos, eles deverão ser capazes de passar as barreiras físicas e resistir aos efeitos dos fatores celulares e humorais presentes no carrapato. A interação biológica carrapato-patógeno é resultado de um processo de coevolução contínua, que envolve o sistema imune do vetor e os mecanismos dos microrganismos de escape destas defesas.

A interação biológica de algumas espécies, pode trazer mútuo beneficiamento, como é o caso da interação entre *I. scapularis* e *A. phagocytophilum*, onde os carrapatos infectados pela bactéria, conseguem sobreviver em baixas temperaturas. No carrapato, a bactéria induz a expressão de uma glicoproteína anticongelante chamada de IAFGP (*Ixodes scapularis antifreeze glycoproteins*), que aumenta a sobrevivência de carrapatos infectados, fazendo com que as bactérias também sobrevivam e conseqüentemente sejam transmitidas com sucesso para o hospedeiro vertebrado (NEELAKANTA et al., 2010).

Estudos funcionais da interação carrapatos-*Anaplasma* spp. demonstraram que diversos genes do carrapato podem estar relacionados com a infecção bacteriana. Bactérias *A. phagocytophilum* conseguem manipular diversos genes de *I. scapularis*, como a proteína Salp16, que tem sua expressão gênica induzida nas glândulas salivares de carrapatos infectados. O silenciamento do gene da Salp16 causa uma diminuição do número de bactérias nas glândulas salivares, porém não altera o número de bactérias no intestino, indicando que esta proteína é indispensável para a multiplicação bacteriana nas glândulas salivares (SUKUMARAN et al., 2006). A infecção por *A. phagocytophilum* também induz a expressão de α 1,3-fucosiltransferases (IsFT), que tem a função de glicosilar proteínas, durante a colonização no *I. scapularis*, após o silenciamento desse gene a aquisição da bactéria pelo carrapato foi diminuída (PEDRA et al., 2010).

Os genes da GST, selenoproteína M (SelM) e da ubiquitina foram induzidos após infecção com *A. marginale* tanto em células do *D. variabilis* (IDE8), quanto em carrapatos (DE LA FUENTE et al., 2007). O silenciamento destes genes, em *D. variabilis*, fez com que ocorresse a diminuição no número de *A. marginale* no intestino dos carrapatos, após aquisição das bactérias em bezerro infectado (KOCAN et al., 2009). A SelM contém seleno-cisteína e tem a função de antioxidante (REEVES; HOFFMANN, 2009). As ubiquitinas são proteínas reguladoras que estão envolvidas na marcação e destruição intracelular de proteínas, podendo regular vias imunes (FERRANDON et al., 2007).

Em bibliotecas subtrativas de cDNA construídas com células BME26 (originadas do carrapato *R. microplus*) infectadas com *A. marginale*, foram identificados 30 genes induzidos e 42 genes reprimidos pela infecção, pertencentes a diversas categorias funcionais. Posteriormente, foram selecionados alguns genes para um estudo funcional

in vivo, através de silenciamento gênico. Os resultados mostraram que apesar de não ter sido detectado alteração no número de bactérias no intestino e nas glândulas salivares nos carrapatos infectados, observou-se que carrapatos que tiveram o gene da citocromo c oxidase subunidade III (COXIII) silenciado, não transmitiram a bactéria. A COXIII faz parte do complexo de proteínas da cadeia transportadora de elétrons, localizado na membrana mitocondrial e está envolvido na produção de ATP da célula. O mecanismo de ação de COXIII na transmissão ainda é desconhecido, no entanto, a hipótese levantada para o fenótipo observado é que COXIII seja importante para que as bactérias ultrapassem a barreira das glândulas salivares para atingirem a saliva e serem transmitidas para o hospedeiro vertebrado ou que atue na viabilidade de *A. marginale* que estão na saliva do carrapato (BIFANO et al., 2014).

A microbiota intestinal do *I. scapularis* é capaz de modular os níveis de expressão de Stat (fator de transcrição da via Jak/Stat). A via Jak/Stat é conhecida por regular a transcrição de genes de resposta imune, mas também de genes envolvidos na reparação e remodelação do epitélio (ZEIDLER et al., 2000), e dados mostram que a via regula a expressão da peritrofina, uma glicoproteína da matriz peritrófica (MP), que mantém a integridade estrutural da camada entre o lúmen e o epitélio intestinal (NARASIMHAN et al., 2014). Quando a microbiota do carrapato é desregulada, a expressão de Stat é diminuída e a colonização pela espiroqueta *B. burgdorferi*, a qual o carrapato é vetor, também é diminuída. Durante a alimentação sanguínea, no lúmen intestinal, diversas respostas imunes (ERO, PAMs e PAMs gerados de fragmentos da hemoglobina) podem prejudicar a viabilidade das espiroquetas, que utilizam a MP para se proteger dos ataques nocivos. Sem a microbiota, a expressão de Stat é diminuída, e consequentemente a expressão da peritrofina também é diminuída, tornando a MP permeável, não protegendo a *Borrelia*. Com a MP permeável, outras bactérias intestinais se aproximam do epitélio intestinal, elevando as respostas imunitárias epiteliais do intestino (WEISS et al., 2013), comprometendo ainda mais a colonização da *Borrelia*. Esta interação microbiota-carrapato-patógeno demonstra que a microbiota tem um papel fundamental no intestino, para manter a integridade estrutural e funcional intestinal a favor da colonização da *Borrelia* (NARASIMHAN et al., 2014). Estudos envolvendo várias espécies de carrapatos dos gêneros *Ixodes*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* e

Haemaphysalis, em vários estádios de desenvolvimento, avaliaram as bactérias predominantes no microbioma em diferentes tecidos. No intestino, foram encontrados *Rickettsia* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp.; nos túbulos de Malpighi, *Rickettsia* spp., *Coxiella* spp. e *Francisella* spp.; nas glândulas salivares, *Rickettsia* spp., *Francisella* spp. e *Wolbachia* spp.; e no ovário, *Francisella* spp., *Coxiella* spp., *Wolbachia* spp., e *Rickettsia* spp. (revisado por NARASIMHAN; FIKRIG, 2015).

Estudos sobre a interação entre patógenos causadores de doenças, seus carrapatos vetores e a interface com o hospedeiro vertebrado são importantes para gerar dados que possam servir de base para outros trabalhos que envolvam novas estratégias de controle do vetor ou do bloqueio da transmissão dos patógenos.

Há quase duas décadas, nosso grupo de pesquisa vem estudando aspectos do sistema imunológico do carrapato *R. microplus*. Diferentes famílias de PAMs foram identificadas e caracterizadas (CRUZ et al., 2010; BELMONTE et al., 2012; FOGACA et al., 1999, 2004, 2006; MACHADO et al., 2007; 2011; SFORCA et al., 2005; SILVA et al., 2009), além de ter sido demonstrada a participação dos hemócitos na defesa contra microrganismos através da fagocitose e da produção de EROs (PEREIRA et al., 2001).

Além disso, demonstramos também que as células BME26 desempenham funções imunológicas tais como fagocitose e expressão de genes envolvidos na resposta imune (ESTEVEES et al., 2008), além de serem suscetíveis à infecção por *A. marginale* (ESTEVEES et al., 2009). Entretanto, até o presente momento, pouco se conhece a respeito das vias de sinalização celular que modulam a expressão dos PAMs em carrapatos, e para preencher essa lacuna no conhecimento da imunologia destes ectoparasitos, estabelecemos os objetivos propostos a seguir.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

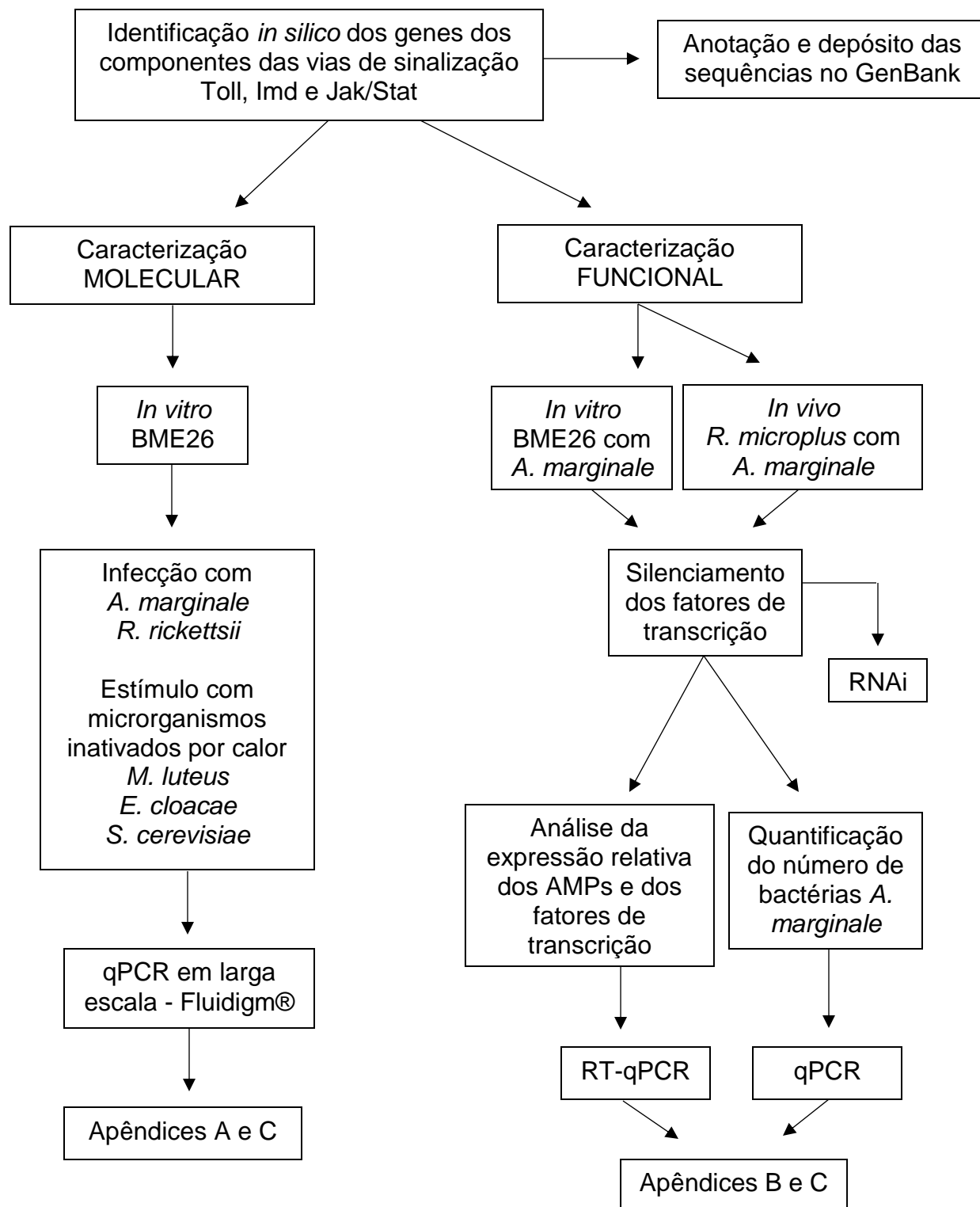
O objetivo geral deste trabalho visa caracterizar molecular e funcionalmente as vias de sinalização celular implicadas na modulação de genes envolvidos nas respostas imunológicas do carrapato *R. microplus*.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar *in silico* os componentes das vias imunológicas de sinalização Toll, Imd, Jnk e Jak/Sat do carrapato *R. microplus*;
2. Caracterizar o perfil de expressão dos genes das vias de sinalização celular em células BME26 frente a diferentes estímulos microbianos;
3. Avaliar a importância das vias Toll, Imd e Jak/Stat *in vitro* e *in vivo*, no controle da infecção por *A. marginale*;
4. Correlacionar as vias Toll, Imd e Jak/Stat *in vivo*, com a regulação da expressão gênica dos PAMs.

3 Material e Métodos

O fluxograma abaixo resume as principais etapas e técnicas realizadas no presente estudo.



3.1 Análise *in silico* dos homólogos dos genes envolvidos nas vias de sinalização

Inicialmente, em colaboração com o Dr. Rafael Diego da Rosa, do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura, do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), foi realizada uma busca, análise *in silico* e anotação dos homólogos dos genes envolvidos nas vias de sinalização celular do carrapato *R. microplus*. A busca foi feita em bancos públicos, em sequências relacionadas com as vias de sinalização, já descritas em: *D. melanogaster*, *Acrythosiphon pisum*, *Apis mellífera*, *Anopheles gambiae* e *Nasonia vitripennis*, nos crustáceos *Litopenaeus vannamei*, *Carcinoscorpius rotundicauda*, *Marsupenaeus japonicus* e *Penaeus monodon* e nos carrapatos *I. scapularis*, *Rhipicephalus pulchellus* e *R. microplus*.

Paralelamente, em colaboração com os professores Dr. Rafael Dias Mesquita, do Laboratório de Bioinformática e Dra. Glória Regina Cardoso Braz, do Laboratório de Bioquímica de Vetores de Doenças, ambos do Departamento de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), foi montada uma base de dados com mais de 263 mil sequências de *R. microplus*, a partir de sequências acessíveis no GenBank e em outros três bancos de dados para essa espécie de carrapato (The Gene Index Project (disponível em: <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>), *R. microplus* database (<http://boophilus.iq.ufrj.br/>), e outro não disponibilizado online, que contém sequências obtidas do transcriptoma (*Illumina Sequencing*) a partir de órgãos isolados (glândulas salivares, ovários, corpo gorduroso, singânglio e intestino) e de diferentes estádios de desenvolvimento (embriões, larvas e adultos) de *R. microplus*).

Com o auxílio da plataforma computacional *Functional Analysis Tool* (FAT 2.0beta) (SEABRA-JUNIOR et al., 2011) foi realizada uma busca das sequências anotadas pelo Dr. Rafael da Rosa, no banco montado pelo colaboradores Dr Rafael Mesquita e Dra Gloria Brás. As sequências resultantes desse levantamento foram comparadas com genes homólogos depositados em bancos públicos, através de alinhamentos e busca de domínios dos genes com o auxílio da ferramenta *Global Align* e *CD-search* do Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

3.1.1 Sequências de Dorsal e Cactus

As sequências de Dorsal e Cactus (fator de transcrição e inibidor da via Toll) não foram encontradas na análise *in silico* na base de dados do carrapato *R. microplus* (item 3.1), mas foram encontradas em outras espécies de carrapatos (*I. ricinus* e *R. pulchellus*). Oligonucleotídeos baseados nas duas sequências foram desenhados e testados em cDNA das células BME26.

As reações de PCR foram preparadas com 2,5 µL do tampão da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,5 µL dNTPs (10 mM), 1 µL MgCl₂ (50 mM), 1,6 µL da mistura de cada par de oligonucleotídeos (senso e antisenso) (10 mM) (**Tabela 1**), 100 ng de BME26 sem infecção, 0,02 µL da enzima Taq DNA polimerase e qsp 25 µL de água livre de nucleases. As reações foram realizadas em um termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil) no programa térmico de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 56 – 62 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido da extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados, foram sequenciados conforme item 3.5.1, e as sequências de Dorsal e Cactus de *R. microplus* foram depositadas no GenBank (números de acesso: KF828755 e KF828754, respectivamente).

3.2 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados manualmente e sintetizados pela Invitrogen ou IDT (**Tabela 1**). O programa *FastPCR Professional Software* (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>) foi utilizado para a avaliação de complementariedade e possível formação de dímeros. Os oligonucleotídeos usados para a síntese das dsRNA (ensaios de silenciamento gênico) foram acrescidos da sequência promotora T7.

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para os ensaios de PCR, qPCR, RT-qPCR e síntese das dsRNA, acrescidas da sequência promotora T7 (sublinhadas).

Gene	Banco de Dados [Número de acesso]	Oligonucleotídeo senso (S) e antiseno (AS) (5'-3')	Amplicon (Pb)	Anotação funcional	Ensaio
Proteína ribossomal S3A	TIGR [TC17690]	(S) GGACGACCGATGGCTACCT (AS) TGAGTTGATTGGCGCACTTCT	69	Gene de Referência	Fluidigm qPCR
Malato desidrogenase	TIGR [TC16610]	(S) AAAGTGTCCCAGTACGAGTC (AS) TTCTTGACGAAGTCCTCTCC	89	Gene de Referência	Fluidigm
Glutamato desidrogenase	TIGR [TC17387]	(S) GCCAGACAAATCATGCGTAC (AS) AGCTAAGTGAAGGTGAGACC	128	Gene de Referência	Fluidigm
Citocromo C oxidorreductase	TIGR [TC15406]	(S) GGGGAAGCTTCTGTTGACATG (AS) ATCAACCACCTCTGGGTTCTG	79	Gene de Referência	Fluidigm
Spätzle	GenBank [KF828742]	(S) CCATTGTCAACACGCAGCAC (AS) CCACTTGTACTTCTGCTCGC	110	Via Toll	Fluidigm
Toll	GenBank [KF828744]	(S) CATCATTCGTGTGCAGTGTG (AS) ACCAGTTGCAATGACGTCAC	165	Via Toll	Fluidigm
Toll18W	GenBank [KF828745]	(S) CAGAACCTGGACATCAATGC (AS) CTTGAGGATACTGACCATCC	145	Via Toll	Fluidigm
MyD88	GenBank [KF828746]	(S) CTGTCAAAGACGAGAACGAG (AS) TGGAATCGCTAGACATGCTG	96	Via Toll	Fluidigm
Tollip	GenBank [KF828747]	(S) CATCTGGCACCCACTTTCAG (AS) GACCCATGGGAGCTCTTATC	104	Via Toll	Fluidigm
Ecsit	GenBank [KF828753]	(S) CCCAAACTCAGCGATATTC (AS) CTTGCACTCATTGTCCGGTTG	133	Via Toll	Fluidigm
TRAF	TIGR [TC24880]	(S) AATGGCGTCAACACACTACG (AS) TCATTTCTGTGACGCGTGTGC	179	Via Toll	Fluidigm
Cactin	GenBank [KF828752]	(S) CCCACTGGTTAAATGGGAAG (AS) CCCATCAATCAACAGTGTGC	100	Via Toll	Fluidigm
Tube	GenBank [KF828748]	(S) ATGAAACACCACGGTTCTGG (AS) TGTGCCTTTGTACACGACTC	125	Via Toll	Fluidigm
Pelle	GenBank [KF828749]	(S) GTTCCAACCATGTGAAGAGC (AS) GTATTCACAGCAGTCTTCGG	159	Via Toll	Fluidigm
Pellino	GenBank [KF828750]	(S) GGCGGAGTAAATTCTTCCTG (AS) GTGTACGAAATGGAGTGCTG	130	Via Toll	Fluidigm
Sarm	GenBank [KF828751]	(S) CCATACGCGGTTTGAACCAG (AS) GACATCGAGGCTCTTGTTC	68	Via Toll	Fluidigm
Cactus	GenBank: [KF828754]	(S) CAGTGTGCGAGAGATGTATG (AS) CGCTCCCGAACATTGGGGTC	510	Via Toll	Clone Molecular PCR
		(S) CAGTGTGCGAGAGATGTATG (AS) CTTTAAATGACCCGATGTGC	68		Fluidigm RT-qPCR
Dorsal	GenBank: [KF828755]	(S) AGCACCGCCGAGAACAAGAC (AS) ATGGCCACCTGCTTGTGCAC	620	Via Toll	Clone Molecular PCR
		(S) CATATCGGGTACATCCACAC (AS) GGCTTGAAAGGTGCATGTC	102		RT-qPCR

		(S) <u>TAATACGACTCACTATAGGCTT</u> GTTGGCAAGGAAGGCTG (AS) <u>TAATACGACTCACTATAGGCGCTCCTCCTCAAACCACAC</u>	434		Silenciamento dsRNA
		(S) <u>TAATACGACTCACTATAGGGCTTCCAAGT</u> GTTCTCGAA (AS) <u>TAATACGACTCACTATAGGCATCTCGCTCCTCCTCAAAC</u>	328		Silenciamento dsRNA2
PGRP	GenBank [KF828741]	(S) TCGCAGAGAATGCGCTACTG (AS) TTCGTGTGAGCGCCTTCTGC	137	Via Imd	Fluidigm
Bendless	GenBank [KF828762]	(S) GTACGGTGCTATTGTCCATC (AS) CATTGCGTATTGCCTTGTC	143	Via Imd	Fluidigm
Uev1a	GenBank [KF828763]	(S) ATGTCTGACGAACGGGAACG (AS) TCATGCCAGTCCAGTGAGTC	154	Via Imd	Fluidigm
Effete	GenBank [KF828764]	(S) CCACGCGAATCTATCATCCC (AS) TCGACAGCAGCACTTTGGAG	108	Via Imd	Fluidigm
IAP2	GenBank [KF828765]	(S) CGGAATGACAACCTGAACTGG (AS) CCAAGAACCTGTAGAAGCTC	162	Via Imd	Fluidigm
TAK1	GenBank [FG301710]	(S) CCGTGTATTGGTACAGAGTG (AS) GTAGCAGAACTACACCACC	99	Via Imd	Fluidigm
TAB2	GenBank [KF828757]	(S) CCAACAGCTTCGAACACAAG (AS) GCAGGGTCTTTAGTTCTTCC	101	Via Imd	Fluidigm
Posh	GenBank [KF828766]	(S) CTGATGAAGCGACTCACAGC (AS) AGCTGTCCACGAAACTTGGG	88	Via Imd	Fluidigm
IKK	GenBank [KF828758]	(S) GCATTATTGCACTACTCGCC (AS) CAGAGCAGGAATCTTCGAAC	175	Via Imd	Fluidigm
NEMO	GenBank [KF828759]	(S) TCACGGTGCAGGATATACAG (AS) GCAGAGCATCTTGATCTCTC	173	Via Imd	Fluidigm
Caspar	GenBank [KF828756]	(S) GTATTCAGCAGCGAAATGGC (AS) GTTGCTTATCCTTCTCCTGG	130	Via Imd	Fluidigm
CDX4	GenBank [KF828761]	(S) CACCTTCTCAGAGTCTCAGC (AS) GTCCGATGTTTATTGCCAGC	101	Via Imd	Fluidigm
Relish	GenBank [KF828760]	(S) GCACGACAGCCAATTATTCG (AS) CTCTTGCTCAGCAGAAGAAG	139	Via Imd	Fluidigm RT-qPCR
		(S) <u>TAATACGACTCACTATAGGCTTCTTCTTCTGCTGAGC</u> (AS) <u>TAATACGACTCACTATAGGAGACGATAGACATGCTGG</u>	454	Via Imd	Silenciamento dsRNA
		(S) <u>TAATACGACTCACTATAGGGCAAATCGCAAGTCAGGATC</u> (AS) <u>TAATACGACTCACTATAGGTCGCAATCAGCTG</u>	295		Silenciamento dsRNA2
Hemipterous	GenBank [KF828767]	(S) CGATGCATCCGTGATCGTAG (AS) CCAGGTGTTTCTTGGAAACCG	157	Via Jnk	Fluidigm
Basket	GenBank [KF828768]	(S) CAAGGCAAGCAACATTGAGC (AS) TTCATGGGAGGAACTGTGAC	140	Via Jnk	Fluidigm
Jra	GenBank [KF828769]	(S) TGACCCTGGACTTGAACAGC (AS) AGCTGGAGCATGTTTCAAGGTC	94	Via Jnk	Fluidigm
Kayak	GenBank [CK187762]	(S) CTCATCTGTGGAGTTCATGG (AS) GTCAATCAGCAGCACTAGGAG	112	Via Jnk	Fluidigm
Puckered	GenBank [KF828770]	(S) GCGCTTTCATCTGGTGGATC (AS) GCGAAGATCCATTCCACGAC	108	Via Jnk	Fluidigm
Domeless	GenBank [KF828773]	(S) CAGCGATTGCACTCACATTC (AS) CTCCATGTTCAAGGTCATGC	158	Via Jak/Stat	Fluidigm
Jak	GenBank [KF828771]	(S) CAGAGGTGATGCTAGTCATG (AS) ATGAGCTGTGGATGAGTGAC	94	Via Jak/Stat	Fluidigm

Stat	GenBank [KF828772]	(S) TAGTGTTCCAGGTTTGGACG (AS) CCGTCGCAGACTTAAACTTC	195	Via Jak/Stat	Fluidigm RT-qPCR
		(S) TAATACGACTCACTATAGGCACAGTAACCTGGGACAATG (AS) TAATACGACTCACTATAGGCGCGGGTGACTTTCATGATG	296		Silenciamento dsRNA
		(S) TAATACGACTCACTATAGGTTGTCAGCTTTAGGAACATG (AS) TAATACGACTCACTATAGGTTGGTGCCAGGGAACCTTGTC	239		Silenciamento dsRNA2
Pias	GenBank [KF828774]	(S) GCATCTACCTCCAGAAGCTC (AS) CATCCTCATCACTGCTGCAC	118	Via Jak/Stat	Fluidigm
Stam	GenBank [KF828776]	(S) GCATGACGCGAATCCTCGAA (AS) CAGCTCCTGCTCTATCAAGG	102	Via Jak/Stat	Fluidigm
Microplusina	GenBank [AY233212]	(S) CAGTGAAGCCTTCGCATCAG (AS) CCGAAGTCGAAGCCACAAG	120	PAM	Fluidigm RT-qPCR
Hebraína	GenBank [AAR97292.1]	(S) TGAAGCTGCCATGGCGAACC (AS) TGGTGGTGATGGTGGTGACC	102	PAM	Fluidigm
Defensina	GenBank [AY233213]	(S) GATGCCCGTTTAACCAAGGA (AS) TTGATTAGGCCAGCGCAGTA	82	PAM	Fluidigm RT-qPCR
Scasina	TIGR [CK185679]	(S) TCGACATAGGTCTTGGATGC (AS) GTACAGACGATGTTGAACGG	112	PAM	Fluidigm
Ixodidina	GenBank [P83516]	(S) CAAAATGCAGTCCCCTTACGT (AS) CCACGACGGCAGAAGCATCC	210	PAM	Fluidigm RT-qPCR
Lisozima	TIGR [TC21088]	(S) AAACGACGACATCACTGACG (AS) TGTAGTTGACTCCTCTGCAG	107	PAM	Fluidigm RT-qPCR
msp5	GenBank [M933921]	(S) CTTCCGAAGTTGTAAGTGAGGGCA (AS) CTTATCGGCATGGTCGCCTAGTTT	203	Proteína de Superfície	qPCR
		Sonda <i>TaqMan</i> : 56 FAM/GCCTCCGCGTCTTTCAACAATTTGGT/BHQ1	-		
glta	GenBank [CP0008481]	(S) GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT (AS) AGGGTCTTCGTGCATTTCTT	147	Ciclo de Krebs	qPCR
		Sonda <i>TaqMan</i> : 56 FAM/CATTGTGCCATCCAGCCTACGGT/BHQ1	-		
GFP	GenBank [ABE28520.1]	(S) TAATACGACTCACTATAGGGGCGACGTAACGGCCACAAGTT (AS) TAATACGACTCACTATAGGCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTC	309	Gene não relacionado	Silenciamento

3.3 Material Biológico

3.3.1 Células embrionárias BME26

Foi utilizada a cultura celular embrionária do carrapato *R. microplus*, linhagem BME26 (ESTEVEZ et al., 2008) cultivada em meio de cultura Leibovitz L-15 (Invitrogen São Paulo, SP, Brasil) suplementado com 5% de soro fetal bovino termo-inativado (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), 10% de caldo fosfato triptose, 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 0,1% de lipoproteína bovina (MP Biomedicals, São Caetano Do Sul, SP, Brasil) com pH 7,2. As células foram mantidas a 34 °C na ausência de dióxido de carbono (CO₂) e o meio de cultura trocado semanalmente.

3.3.2 Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram as bactérias *A. marginale* cepa Jaboticabal (para os experimentos com as células BME26) (DE ANDRADE et al., 2004) e cepa *St. Maries* (para os experimentos com carrapatos *R. microplus*) (ERIKS et al., 1994), *Rickettsia rickettsii* cepa Taiaçú (PINTER E LABRUNA, 2006), a bactéria Gram-negativa *Enterobacter cloacae* K12 (cedida gentilmente pelo Dr. Hans G. Boman da Universidade de Estocolmo na Suécia), a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (ATCC 9341A) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 208353).

3.3.3 Carrapatos *Rhipicephalus microplus* e bezerras

Os carrapatos machos *R. microplus* (cepa La Minita), livres de *Anaplasma* sp. e outros patógenos, foram provenientes do *USDA Agricultural Research Service* cuja unidade está localizada em Moscow, estado de Idaho nos Estados Unidos da América. Foram utilizados cinco bezerras da raça Holstein não-esplenectomizados, com 5 a 7 meses e livres de *A. marginale*. Rotineiramente são realizados, pelos técnicos responsáveis do biotério, ensaios de CI-ELISA (*Competitive Inhibition Enzyme-Linked*

Immunosorbent Assay) e nested PCR (KNOWLES et al., 1996; SCOLES et al., 2007) para verificar se os animais estão livres de *A. marginale*.

3.4 Avaliação da expressão gênica dos componentes das vias de sinalização nas células BME26 após diferentes desafios microbianos

As células BME26 foram preparadas a partir de garrafas de cultivo celular de 75 cm² (Jet-Biofil, Guangzhou, China) com monocamada de células (aproximadamente 2 x 10⁶ células/mL). A monocamada foi lavada com PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, pH 7,4) esterilizado e as células removidas pela adição de 500 µL de Tripsina (5 mg/mL) (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil). A viabilidade celular foi determinada através de azul de Tripán (0,4% em PBS) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e o número de células foi determinado em câmara de Neubauer. Em seguida 7,5 x 10⁵/mL células foram transferidas para garrafas de cultivo de 12,5 cm² (Jet-Biofil) e incubadas em meio de cultivo sem antibiótico. Após 24 horas, o meio de cultivo foi descartado e substituído por meio de cultura com os diferentes inóculos (item 3.3.3), preparados como descrito a seguir, com exceção da *A. marginale* cepa *St. Maries* que foi utilizada somente nos experimentos *in vivo* envolvendo bezerros e carrapatos. Para cada amostra, foram feitas 3 réplicas biológicas, nos tempos de incubação de 6, 24 e 72 horas.

3.4.1 Preparação dos inóculos

3.4.1.1 *Anaplasma marginale* (cepa Jaboticabal)

Com o objetivo de obter uma maior quantidade do inóculo de *A. marginale* para os experimentos, bovinos provenientes de uma área livre de carrapatos e livres de anaplasmoze bovina, foram inoculados com a bactéria *A. marginale*, gentilmente cedida pela Prof. Dra Rosângela Zacaria Machado, do Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). Os bovinos foram mantidos no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), localizado em Eldorado do Sul/RS,

e monitorados pelo Dr Guilherme Marcondes Klafke e Dr José Reck Junior. No pico da parasitemia o sangue foi coletado na presença de anticoagulante (ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio monobásico e dextrose). Para o congelamento, o sangue foi diluído em 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) esterilizado (Carlo Erba Reagents, São Paulo, SP, Brasil), homogeneizado por inversão e aliqotado em criotubos, no volume de 1,8 mL. Os criotubos foram deixados 16 horas no freezer -70 °C e em seguida transferidos para o nitrogênio líquido até o momento do uso.

As células BME26 foram inoculadas com sangue contendo *A. marginale*, sendo que o inóculo foi preparado seguindo o protocolo de Stevens e colaboradores (2007). Resumidamente, o sangue foi descongelado em banho úmido a 37 °C e centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento contendo fragmentos celulares e *A. marginale* foi lavado duas vezes com PBS 1 x esterilizado por centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente e suspenso em 750 µL de PBS. Esta suspensão contendo *A. marginale* foi utilizada para a infecção das células.

3.4.1.2 *Rickettsia rickettsii* (cepa Taiacu)

O inóculo de *R. rickettsii* foi cedida gentilmente pela professora Dra Andréa Cristina Fogaça do Laboratório de Bioquímica e Imunologia de Artrópodes, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo. O inóculo proveniente de BME26 criopreservadas, foi descongelado em banho úmido a 37 °C e suspenso em PBS 1 x esterilizado. O inóculo foi quantificado por qPCR, como descrito no item 3.4.3.

3.4.1.3 Microrganismos termo-inativados: *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae* e *Sacharomyces cerevisiae*

Suspensões das bactérias *M. luteus* (10⁷ bactérias/mL) e *E. cloacae* (10⁸ bactérias/mL) e do fungo *S. cerevisiae* (10⁷ leveduras/mL) em PBS foram incubadas em um banho úmido a uma temperatura de 75 °C por 30 minutos, para inativação dos microrganismos. Para confirmação do tratamento, 100 µL das culturas foram semeadas em meio LB-ágar (para as bactérias) e meio *Yeast Extract*-ágar (para a levedura)

incubadas a 37 °C (para as bactérias) ou a 30 °C (para a levedura) por 16 horas. As células BME26 foram incubadas com a bactéria *M. luteus* e *E. cloacae* em um MOI 100:1 e com *S. cerevisiae* em um de MOI 5:1. Para a infecção por *R. rickettsii* foi utilizado o MOI $3,3 \times 10^{-2}$:1 e para a infecção por *A. marginale* foi usado o MOI 941:1. Os controles negativos foram: BME26 sem estímulo, lisado celular livre de *R. rickettsii* e eritrócitos bovinos livres de *A. marginale*. Como controle positivo foi utilizado um cDNA referente a um *pool* de ovos, larvas e fêmeas parcialmente ingurgitadas. Este controle serviu para confirmar a expressão dos genes no carrapato.

Após 6, 24 e 72 horas de incubação com os desafios microbianos, o sobrenadante das células foi descartado e a monocamada celular foi lavada com PBS 1 x, em seguida removida com Tripsina/EDTA (5 mg/mL) (Vitrocell). As células em suspensão foram centrifugadas a 3.000 x g, durante 10 minutos a 4 °C e o sedimento foi usado para a extração de DNA e/ou RNA.

3.4.2 Extração de DNA, RNA e síntese de cDNA

A extração do DNA foi realizada com auxílio do kit *Smarter Nucleic Acid Sample Preparation* (Strattec molecular, Berlim, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A extração de RNA foi realizada com TRIzol® *Reagent* (Invitrogen), também de acordo com as orientações do fabricante. O RNA obtido foi tratado com DNase (Invitrogen) e, em seguida, precipitado com acetato de sódio 3 M pH 5,2 e isopropanol (Sigma-Aldrich) (1:1, v/v). DNA e RNA foram quantificados pelo NanoDrop (ND-1000) (Thermo Scientific, São Paulo, SP, Brasil) e ambos armazenados a -80 °C para posterior utilização.

O RNA total foi utilizado como molde para a síntese de cDNA, com auxílio da enzima SuperScriptIII™ (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O material foi armazenado a -20 °C para posterior utilização.

3.4.3 Quantificação do número de bactérias *Anaplasma marginale* e *Rickettsia rickettsii* por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A quantificação do número total de bactérias *A. marginale* e *R. rickettsii* foi determinada por qPCR, através da amplificação dos genes de cópia única *msp5* de *A. marginale* (BIFANO et al., 2014) e *gltA* de *R. rickettsii* (GALLETTI et al., 2013). As reações foram realizadas num volume final de 15 µL na presença de 7,5 µL do TaqMan® 2x PCR Master Mix (Thermo Scientific), 1,2 µL da mistura de cada par de oligonucleotídeos (0,4 µM), 2 µL de DNA (aproximadamente 100 ng), 0,02 µL da sonda específica para cada bactéria (**Tabela 1**) e 3,48 µL de H₂O livre de nucleases. As reações foram realizadas em placas com 96 poços, em termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil) usando o programa térmico de desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos. Para a determinação do número total de bactérias, uma curva padrão foi construída com diluições seriadas na base 10 de DNA plasmidial contendo o fragmento do gene *msp5* e o *gltA* em concentrações conhecidas. Todas as amostras foram analisadas em triplicata técnica.

3.4.4 Cinética de expressão gênica através do PCR quantitativo (qPCR) em larga escala (Fluidigm)

Para a análise global e cinética de expressão gênica das células BME26 expostas a diferentes microrganismos, foi utilizada a tecnologia de qPCR em larga escala (Fluidigm® BioMark System) em colaboração com Prof. Dr. Milton Moraes, no Laboratório de Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz – Rio de Janeiro).

O cDNA das células BME26 expostas aos diferentes estímulos foi submetido a um passo de pré-amplificação. Em uma placa de 96 poços foi adicionado à cada cDNA, 2,5 µL de um *pool* contendo todos os 96 pares de oligonucleotídeos (concentração final de 0,2 µM) e 5 µL do TaqMan PreAmp Master Mix 2 x (Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil). A placa foi centrifugada a 1000 x *g* por 2 minutos a 4 °C, as reações foram realizadas em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf), com o seguinte programa térmico: 95 °C por 10 minutos e 14 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por

4 minutos. As amostras de cDNA pré-amplificadas foram diluídas em 40 µL de água ultrapura livre de nucleases e foram congeladas a -20 °C até o momento do uso.

A qPCR em larga escala foi realizada seguindo as instruções do fabricante. De forma resumida, uma solução contendo 368 µL de TaqMan Gene Expression Master Mix 2 x (Life Technologies), 36 µL de DNA Binding Dye Sample Loading Reagent 20 x (Fluidigm Corporation, São Francisco, CA, EUA), 36 µL de EvaGreen 20 x (Biotium, Hayward, CA, EUA) e 100 µL de Tris-EDTA 1 x foi preparada e 5 µL desta mistura foi adicionada a 1,7 µL de cada amostra de cDNA pré-amplificado. Da mesma maneira, foi preparado uma outra solução contendo 385 µL de Assay Loading Reagent 2 x (Fluidigm Corporation) e 193 µL de Tris-EDTA 1 x e 5 µL desta mistura foi adicionada a 1,7 µL de cada par de oligonucleotídeos a ser analisado. As reações foram realizadas em um termociclador BioMark (Fluidigm Corporation) e seguiu o programa térmico de 95 °C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A especificidade do produto amplificado foi determinada através da análise da curva de dissociação mediante o incremento da fluorescência em 0,5 °C de 60 °C a 95 °C.

3.4.4.1 Análise dos dados

Para análise da expressão gênica dos componentes das vias de sinalização em células BME26 desafiadas com diferentes microrganismos, cinco genes de referência foram escolhidos baseados nos resultados de Nijhof e colaboradores (2009): fator de alongação 1-alpha, proteína ribossomal L4, gliceraldeído 3-fosfatase desidrogenase, β-actina e o gene da proteína ribossomal S3a, já utilizado por nosso grupo (FOGAÇA et al., 2004). Contudo, os genes sugeridos por Nijhof apresentaram variação na expressão dentre as diferentes amostras de BME26 infectadas/estimuladas pelos microrganismos. Assim, uma nova busca foi realizada e foram selecionados genes cuja expressão não foi modulada dentre as amostras testadas, foram eles: malato desidrogenase, glutamato desidrogenase, citocrome c oxidoreductase, e proteína ribossomal S3a (**Tabela 1**). Os resultados de expressão gênica foram calculados como a variação na expressão de cada um dos genes em comparação com as células controle, calibradas para a média geométrica dos valores de Ct (*Threshold cycle*) dos quatro genes de referência. A

expressão dos genes das células BME26 submetidas a diferentes desafios foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001). O controle negativo de BME26 sem estímulo no tempo 72 horas, foi usado como condição calibradora para os desafios com os microrganismos termo-inativados *M. luteus*, *E. cloacae* e *S. cerevisiae*. As células BME26 incubadas com eritrócitos bovinos livres de *A. marginale* nos tempos de 6, 24 e 72 horas, foram usadas como condição calibradora para a infecção por *A. marginale* durante 6, 24 e 72 horas, respectivamente. As células BME26 tratadas com lisado celular de BME26 livre de *R. rickettsii* nos tempos de 6, 24 e 72 horas, foram usadas como condição calibradora para a infecção por *R. rickettsii* durante 6, 24 e 72 horas, respectivamente. A análise global da expressão gênica foi realizada utilizando o programa *MultiExperiment Viewer* (MeV) <<http://www.tm4.org/mev/>> no qual foi possível analisar o perfil transcricional do conjunto de dados de todas as condições analisadas.

3.5 Silenciamento gênico das células BME26

3.5.1 PCR convencional e sequenciamento

As reações de PCR para obtenção de DNA para a síntese das dsRNA foram preparadas com 2,5 µL do tampão da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,5 µL dNTPs (10 mM), 1 µL MgCl₂ (50 mM), 1,6 µL da mistura de cada par de oligonucleotídeos (senso e antisenso) (10mM) (**Tabela 1**), 100 ng de BME26 sem infecção, 0,02 µL da enzima Taq DNA polimerase, e qsp 25 µL de água livre de nucleases. As reações foram realizadas em um termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) no programa térmico de desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos seguida pela amplificação do DNA alvo em 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os DNAs correspondentes aos produtos das amplificações das PCRs foram ligados ao vetor *PGEM[®] T Easy Vector Systems* (Promega), conforme as instruções do fabricante. Para a transformação, o produto de ligação foi incubado com uma cultura de *Escherichia coli* cepa DH5-α em gelo por 30 minutos e submetido a choque térmico a 42 °C por 1 minuto e meio seguidos de 3 minutos no gelo. Depois, foi adicionado à suspensão bacteriana, meio LB e incubação por uma hora a 37 °C com agitação de 200

rpm. Em seguida, 100 μ L da cultura foi semeada em meio LB ágar contendo isopropiltio- β -galactosídeo (IPTG), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo (XGal) e ampicilina. As culturas foram incubadas a 37 °C por 16 horas. As colônias transformadas foram incubadas com meio LB por 16 horas a 37 °C, sob agitação de 200 rpm e submetidas à purificação dos plasmídeos pelo kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado a partir dos plasmídeos foi submetido ao sequenciamento em um sequenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

3.5.2 *Produção de dsRNA*

Os genes codificantes dos fatores de transcrição Dorsal, Relish e Stat foram amplificados a partir do cDNA de células BME26 sem estímulo com oligonucleotídeos específicos para cada gene contendo a sequência promotora T7 (**Tabela 1**), por PCR convencional (item 3.5.1). Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose e purificados usando o kit GeneJet Purification (Fermentas) de acordo com as orientações do fabricante. A síntese das dsRNAs foi realizada utilizando o kit T7 Ribomax™ Express RNAi System (Promega) utilizando como molde aproximadamente 1 μ g de produto de PCR.

3.5.3 *Tratamento das células BME26 com as dsRNA*

As células BME26 foram incubadas com 1 mL de meio de cultivo contendo 10^{13} moléculas de cada dsRNA. No primeiro experimento envolvendo as dsDorsal, dsRelish e dsStat foram feitas dez réplicas biológicas e o controle utilizado foram células tratadas com a solução de suspensão das dsRNAs. Já no segundo experimento com as dsDorsal2, dsRelish2 e dsStat2, foram feitas cinco réplicas biológicas e o controle foi a dsRNA não relacionada GFP (**Tabela 1**).

No primeiro experimento, as células BME26 foram incubadas com as dsRNA por 24 horas e posteriormente infectadas com *A. marginale* (cepa Jaboticabal), por 7 dias

com MOI foi de 497:1, totalizando 8 dias de silenciamento. Já no segundo experimento, sem infecção, as células foram tratadas com as dsRNA por 7 dias.

Após o período de incubação, as células foram submetidas a extração de RNA total, seguida da síntese de cDNA (item 3.4.2). O cDNA foi utilizado para avaliar o porcentual de silenciamento dos genes de interesse e a expressão relativa de genes relacionados com o sistema imune. No experimento envolvendo a infecção com *A. marginale*, além do RNA utilizado para as análises de expressão gênica, o DNA também foi extraído para a quantificação de *A. marginale* (item 3.4.2).

3.5.4 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

3.5.4.1 Curva de eficiência dos oligonucleotídeos

Visando determinar a concentração ideal para as reações de RT-qPCR, curvas de eficiência para os oligonucleotídeos dos fatores de transcrição Dorsal, Relish e Stat, e dos PAMs microplusina, ixodidina, defensina, lizozima e foram feitas utilizando diferentes concentrações de cDNA de BME26 sem estímulo. As reações da PCR foram preparadas em um volume final de 15 µL, contendo 7,5 µL do Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2 x (Thermo Scientific), 1,2 µL da mistura de cada par de oligonucleotídeos (0,4 µM), diferentes concentrações de cDNA (aproximadamente de 500 a 0,97 ng) e qsp 15 µL de H₂O livre de nucleases. As reações foram realizadas em triplicatas técnicas e com no mínimo 7 pontos de diluição do cDNA. As amplificações pelo PCR e as análises foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), no programa térmico de uma pré-incubação de 95 °C por 10 minutos, seguida pela amplificação do DNA alvo em 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e hibridização/extensão a 60 °C por 1 minuto. A curva de dissociação foi realizada imediatamente após a amplificação do DNA alvo com uma taxa de transição de temperatura linear de 0,3 °C de 60 °C a 95 °C com determinação contínua da aquisição da fluorescência.

3.5.4.2 Avaliação do silenciamento gênico dos fatores de transcrição e análise da expressão gênica dos PAMs

Os grupos tratados com dsDorsal, dsRelish e dsStat (experimento 1 – item 3.5.3), foram avaliados quanto ao percentual de silenciamento gênico dos fatores de transcrição Dorsal, Relish e Stat, e a expressão gênica dos PAMs microplusina, defensina, ixodidina e liozima (**Tabela 1**). Os grupos tratados com dsDorsal2, dsRelish2 e dsStat2 (experimento 2 – item 3.5.3) foram avaliados somente quanto ao percentual de silenciamento dos fatores de transcrição. As análises foram realizadas através da RT-qPCR, utilizando o mesmo preparo das reações (50 ng de cDNA/reação) e o programa térmico descritos no item 3.5.1.

A equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi aplicada para calcular a expressão relativa de cada gene analisado, sendo que a quantidade de cDNA das amostras foi normalizado de acordo com o nível de expressão do gene codificante da proteína ribossomal S3A (**Tabela 1**). Para a análise dos efeitos do silenciamento, a condição calibradora foi sempre o grupo tratado com o controle (solução de suspensão das dsRNA, para o experimento 1 ou dsGFP, para o experimento 2).

A significância estatística das diferenças observadas entre os grupos experimentais e os controles foi avaliada utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney com correção de Bonferroni. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As representações gráficas foram feitas pelo software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, CA, EUA).

3.6 Silenciamento gênico dos fatores de transcrição em carrapatos *Rhipicephalus microplus*

Todos os experimentos envolvendo bezerros foi aprovado pelo *Institutional Animal Care and Use Committee and the Biosafety Committee* (IACUC: 2013-66, *Biosafety*: B-010-13) da Universidade de Idaho, Moscow, Idaho, Estados Unidos da América.

3.6.1 Colônia de carrapatos e infecção do bezerro com *Anaplasma marginale* (cepa *St. Maries*)

Um bezerro (nº 1) não infectado foi utilizado para a criação dos carrapatos *R. microplus* que foram utilizados nos experimentos *in vivo*. Aproximadamente dois gramas de ovos de *R. microplus* foram colocados sob uma câmara de algodão aderida no dorso do bezerro. No 14º dia, as ninfas foram removidas manualmente e colocadas na incubadora, a 26 °C e 92% de umidade relativa até mudarem para adultos. Após a muda, os machos foram recolhidos e separados em grupos de cem animais. Outro bezerro (nº 2) foi infectado com *A. marginale* (cepa *St. Maries*), através da inoculação de aproximadamente 10⁸ eritrócitos bovinos com *A. marginale*, como descrito por Futse e colaboradores (2003). A bacteremia foi monitorada através de esfregaço sanguíneo e PCR convencional (através da amplificação do gene *msp5*).

3.6.2 Síntese das dsRNA

Os mesmos procedimentos utilizados no modelo celular BME26, foram feitos nos experimentos envolvendo os carrapatos. As dsRNA foram sintetizadas conforme os itens 3.5.1, com a exceção de que foram amplificadas a partir do cDNA de intestino de carrapatos não infectados, e 3.5.2 desta tese.

3.6.3 Tratamento dos carrapatos com as dsRNA e infecção com *Anaplasma marginale*

Foram utilizados cem carrapatos machos não infectados, logo após a ecdise para o estágio de adultos. Para a injeção, os carrapatos foram fixados em uma fita dupla face com a parte ventral voltada para cima (**Figura 6A**) e injetados na membrana coxal na base da 4ª perna no lado ventral direito (**Figura 6C**), com auxílio de uma seringa Hamilton com agulha de 36 gauge e um equipamento microprocessador de bomba de injeção UMP3 (World Precision Instruments) (BASTOS et al., 2009) (**Figura 6B**), com 10¹¹ moléculas de dsRNA dos genes dos fatores de transcrição dsDorsal, dsRelish e dsStat

individualmente e em conjunto (dsDorsal + dsRelish + dsStat). Um grupo de carrapatos injetados com a solução de suspensão das dsRNA foi usado como grupo controle.

Após injeção das dsRNA, os carrapatos foram colocados em câmaras de algodão afixadas no dorso do bezerro, previamente tricotomizado, no pico da bacteremia para *A. marginale* (**Figura 7**). As câmaras de infestação restringem a área de fixação e impedindo a fuga dos carrapatos. Após 7 dias de alimentação para a aquisição da bactéria, os carrapatos foram transferidos para um outro bezerro (nº 3) não infectado com *A. marginale* para que a replicação bacteriana nas glândulas salivares fosse estimulada, permanecendo no segundo bezerro por 5 dias. Ao final desse período os carrapatos foram removidos do bezerro e transferidos para uma base de parafina com a região dorsal voltada para cima. Com auxílio de uma lâmina de bisturi, toda a cutícula dorsal foi rebatida, permitindo que os órgãos internos fossem expostos. Em seguida, as glândulas salivares e os intestinos foram dissecados, lavados em PBS 1 x esterilizado e transferidos para microtubos de 1,5 mL com TRIzol® Reagent. As glândulas salivares e intestinos de dois carrapatos foram reunidos no mesmo tubo formando um *pool* e foram armazenados a -20 °C até a sua utilização para a extração dos ácidos nucleicos, que foi realizada com TRIzol® Reagent (Invitrogen) de acordo com as orientações do fabricante. O RNA total foi utilizado como molde para a síntese de cDNA conforme descrito no item 3.4.2.

3.6.3.1 Avaliação do silenciamento gênico e da expressão dos PAMs

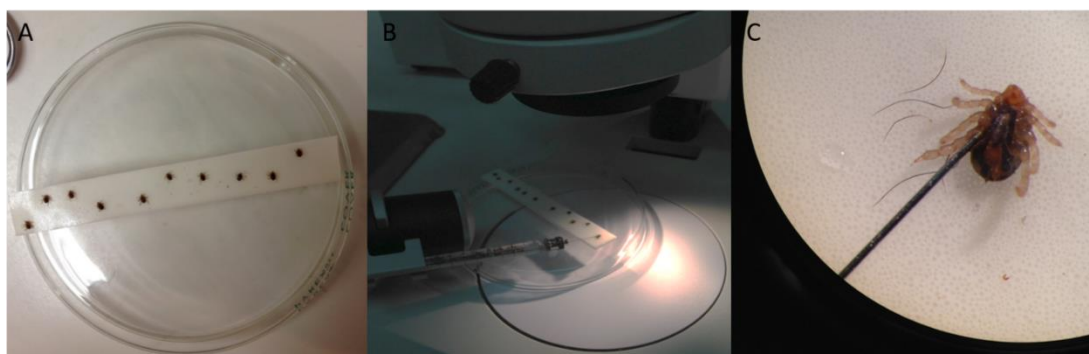
O porcentual de silenciamento dos genes alvo (Dorsal, Relish e Stat) e a expressão gênica dos PAMs foi analisada conforme descrito no item 3.4.5.2., mas utilizando aproximadamente 12 ng de cDNA/reação. O DNA dos carrapatos infectados com *A. marginale* (cepa *St. Maries*) foi utilizado para a quantificação do número de bactérias (item 3.4.3).

3.6.4 Avaliação da modulação gênica dos fatores de transcrição e dos PAMs frente a infecção por *Anaplasma marginale*

Para determinar se a presença da bactéria modula a expressão de genes relacionados ao sistema imune do carrapato, outros dois bezerros não infectados com *A. marginale* (nº 4 e 5) foram usados para a alimentação de um grupo de carrapatos que não foi injetado com dsRNA. No bezerro (nº 4), os carrapatos permaneceram se alimentando por 7 dias e no bezerro (nº 5), por mais 5 dias. As análises de expressão relativa de PAMs e fatores de transcrição deste grupo de carrapatos foi comparado o grupo de carrapatos não injetados com dsRNA mas infectados com *A. marginale* (que se alimentaram no bezerro nº 2).

Depois dos experimentos, todos os bezerros foram sacrificados.

Figura 6 - Metodologia utilizada para a injeção dos carrapatos.



Em A) os carrapatos machos foram fixados em adesivo dupla fita com o ventre voltado para cima. Em B) com o auxílio de lupa e uma agulha Hamilton acoplada em um microprocessador de bomba de injeção, os carrapatos foram injetados com as dsRNA dos fatores de transcrição das vias de sinalização Toll, Imd e Jak/Stat e com o controle. Em C) carrapato sendo injetado. Fonte: Peixoto, 2014, arquivos pessoais.

Figura 7 - Bezerro infectado com *Anaplasma marginale* (cepa *St. Maries*) utilizado nos experimentos de silenciamento gênico dos fatores de transcrição nos carrapatos *Rhipicephalus microplus*.



Nas câmaras de algodão, estavam distribuídos os grupos de carrapatos machos injetados individualmente com dsRNA Dorsal, dsRNA Relish e dsRNA Stat, o grupo triplamente silenciado com dsRNA Dorsal+Relish+Stat, o grupo controle que foi injetado com a solução tampão utilizada para suspender as dsRNA e um grupo de carrapatos não injetados com dsRNA. Fonte: Peixoto, 2014, arquivos pessoais.

4 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho serão apresentados e discutidos de maneira sucinta, a partir dos resumos dos artigos já publicados ou em fase de publicação. O detalhamento dos resultados é apresentado nos artigos anexados e listados a seguir.

Apêndice A

Exploring the immune signaling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: from molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge.

Apêndice B

The transcription factor Relish controls *Anaplasma marginale* infection in the bovine tick *Rhipicephalus microplus*.

Apêndice C

Caracterização funcional das vias de sinalização do sistema imune nas células embrionárias BME26 de *Rhipicephalus microplus*.

4.1 Caracterização molecular e o perfil transcricional após o desafio microbiano dos genes relacionados com as vias de sinalização imunológicas do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Apêndice A - Exploring the immune signaling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: from molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. Rosa R, Capelli-Peixoto, J., Mesquita, R., Kalil, S., Pohl, P., Braz, G., Fogaça, A., Daffre, S. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 59, p. 1-14, 2016.

Em dípteros, o reconhecimento de microrganismos invasores pode ativar diferentes vias de sinalização celular envolvidas na resposta imunológica: Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat, as quais induzem a expressão de peptídeos antimicrobianos (PAMs) e outras moléculas que atuam no controle do patógeno. Apesar de diversos avanços na compreensão da imunidade de insetos “modelo” como a *Drosophila melanogaster*, o conhecimento sobre a ativação de respostas imunes em outros artrópodes, como os carrapatos ainda é muito escasso. Neste trabalho, nós buscamos aprofundar o nosso entendimento a respeito das vias de sinalização intracelular que possam estar envolvidas na imunidade dos carrapatos, através da combinação da busca *in silico* dos componentes das vias com a análise da expressão gênica em larga escala destes genes. Os dados das análises *in silico* revelaram que as vias de sinalização Toll e Jak/Stat são evolutivamente conservadas entre os artrópodes, já que todos os componentes dessas vias foram identificados, entretanto, algumas sequências *upstream* da via Imd, tais como o adaptador Imd e as proteínas associadas Fadd, Dreed, Pirk e Dnr1, assim como a citocina upd ligante da via Jak/Stat descritas em *D. melanogaster* não foram encontradas nos bancos de carrapatos. A partir das sequências das vias de sinalização e de efetores do sistema imune de *R. microplus* foram desenhados oligonucleotídeos para serem utilizados em uma análise de qPCR em larga escala (Fluidigm® BioMark System) das células BME26 infectadas por duas bactérias patogênicas transmitidas por carrapatos (*Anaplasma marginale* e *Rickettsia rickettsii*), e desafiadas por uma bactéria Gram-positiva (*Micrococcus luteus*), uma bactéria Gram-negativa (*Enterobacter cloacae*) e uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). A análise da expressão dos genes

relacionados ao sistema imune revelou diferenças marcantes na expressão gênica das células BME26 infectadas por *A. marginale* em comparação com os outros microrganismos. A presença do *A. marginale* fez que a expressão relativa dos genes relacionados com o sistema imunológico fosse regulada negativamente, sugerindo que a bactéria pode manipular o sistema imunitário do carrapato de modo a favorecer a sua sobrevivência. Já a infecção por *R. rickettsii*, bem como o estímulo pelos outros microrganismos, induziu a expressão de vários genes envolvidos na resposta imune, sendo possível concluir que não há especificidade na modulação dos componentes das vias de sinalização para cada microrganismo, como é descrito em *D. melanogaster*.

4.2 As vias de sinalização do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* controlam a infecção por *Anaplasma marginale*.

Apêndice B - The transcription factor Relish controls *Anaplasma marginale* infection in the bovine tick *Rhipicephalus microplus*. Capelli-Peixoto, J., Carvalho, D. D., Johnson, W. C., Scoles, G. A., Fogaça, A. C., Ueti, M. W., Daffre, S. Manuscrito em preparação.

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um importante vetor da bactéria *Anaplasma marginale*, agente etiológico da anaplasmoose bovina. As respostas imunitárias usadas pelo carrapato no controle da infecção pela bactéria são pouco conhecidas. No presente trabalho foi demonstrado que as vias Toll, Imd e Jak/Stat têm importância no controle da infecção por *A. marginale* no carrapato. Verificamos que o silenciamento, através da técnica de RNA de interferência, dos fatores de transcrição Dorsal (via Toll), Relish (via Imd) e Stat (via Jak/Stat), causou um aumento significativo no número de *A. marginale* nas glândulas salivares do *R. microplus* silenciados em relação ao controle. Ainda, mensurados por RT-qPCR, nossos resultados indicaram que a via Imd controla a regulação do gene codificante do peptídeo antimicrobiano (AMP) microplusina e a via Jak/Stat está envolvida na expressão gênica dos AMPs microplusina, ixodidina, defensina e lisozima. Deste modo, nas glândulas salivares do carrapato *R. microplus*, as vias Toll, Imd e Jak/Stat são importantes para o controle do número de *A. marginale* provavelmente porque regulam a expressão destes AMPs. Esta é a primeira evidência do envolvimento das vias de sinalização no controle da bactéria *A. marginale* pelo *R. microplus*.

4.3 Caracterização funcional das vias de sinalização do sistema imune nas células embrionárias BME26 de *Rhipicephalus microplus*.

Apêndice C. Functional characterization of the immune signaling pathways in cell line BME26 of the *Rhipicephalus microplus*. Capelli-Peixoto, J., Rosa, R. D., Kalil-Perdomo, S. P., Fogaça, A. C., Daffre, S. Manuscrito em preparação.

O carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* causa perdas econômicas significativas para o setor pecuário brasileiro. Além disso, o carrapato atua como vetor da bactéria *Anaplasma marginale*, agente etiológico da anaplasmoose bovina. O conhecimento dos fatores que controlam a infecção por *A. marginale* no carrapato vetor é limitado. Recentemente, nosso grupo identificou, através de análises *in silico*, os componentes das vias de sinalização Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat. Além disso, mostrou que estes componentes são expressos constitutivamente nas células da linhagem BME26 (originária do carrapato *R. microplus*) e que são modulados diferencialmente frente a estímulos por diferentes microrganismos. Além dos componentes das vias de sinalização, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) também foram reprimidos em células BME26 infectadas por *A. marginale*, possivelmente porque a bactéria manipula o sistema imune do carrapato de modo a favorecer sua sobrevivência, propiciando a colonização bem-sucedida do vetor. Em uma caracterização funcional das vias de sinalização, carrapatos *R. microplus* machos, tiveram os fatores de transcrição Dorsal (via Toll), Relish (via Imd) e Stat (via Jak/Stat) silenciados através de RNA de interferência (RNAi) e foram infectados por *A. marginale*. Os resultados indicaram que o fator de transcrição Relish controla a infecção por *A. marginale* no intestino e nas glândulas salivares dos carrapatos, provavelmente via regulação do PAM microplusina. Ainda no sistema *in vivo*, a análise da expressão relativa dos fatores de transcrição revelou um silenciamento inespecífico ocasionado pelas duplas fitas de RNA (dsRNAs) para Dorsal e Stat. Dessa forma, as células BME26 foram utilizadas para investigar o silenciamento inespecífico dos fatores de transcrição detectado nos carrapatos. Para tanto, foram consideradas duas variáveis, sendo a primeira, o uso do grupo controle tratado com solução de suspensão das dsRNAs e de uma dsRNA não relacionada (dsGFP), e a segunda, o efeito *off-target*, comumente relatado na técnica de RNAi. Ambas as variáveis analisadas

sugerem que não existe silenciamento inespecífico pelas dsRNAs dos fatores de transcrição. Assim, nossa hipótese é de que pode ocorrer um *crosstalking* entre as vias de sinalização. Entretanto, mais estudos devem ser realizados de modo a se comprovar esta hipótese. Além disso, nas células BME26, apesar dos fatores terem sido eficientemente silenciados, o número de bactérias *A. marginale* dos grupos tratados foi igual ao do grupo controle, diferente do observado nos carrapatos.

5 Conclusões

A partir de análises *in silico*, a maioria dos genes de *R. microplus* que compõe as vias de sinalização celular Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat foi encontrada, com exceção dos componentes *upstream* da via Imd, tais como os genes *Imd*, *Fadd*, *Pirk*, *Dnr1*, *Dredd*, e da citocina *Unpaired* da via Jak/Stat. Estes resultados demonstraram que as vias Toll, Jnk e Jak/Stat, descritas em dípteros, são conservadas em *R. microplus*.

Os genes dos componentes das vias Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat são diferencialmente expressos nas células BME26 em resposta a desafios microbianos. De maneira global, a incubação das células com os microrganismos termo-inativados, induziu a expressão dos genes que codificam os componentes das quatro vias de sinalização. A análise da transcrição gênica frente à infecção pelas bactérias intracelulares *A. marginale* e *R. rickettsii* revelou diferenças marcantes: enquanto a infecção por *A. marginale*, suprimiu a expressão da maioria dos genes dos componentes das vias e dos PAMs, a infecção por *R. rickettsii*, induziu a expressão da maior parte dos genes.

Em carrapatos machos, o fator de transcrição Relish tem um importante papel no controle da infecção por *A. marginale*, possivelmente através da regulação do PAM microplusina. Por outro lado, o fator de transcrição Stat parece estar envolvido na expressão de outros três PAMs, ixodidina, defensina e lisozima. Entretanto, outros experimentos envolvendo o silenciamento dos PAMs deverão ser realizados para que seja possível confirmar o seu controle sobre a infecção. Diferentemente do verificado nos carrapatos, não se observou diferença no número de *A. marginale* nas células BME26, após o silenciamento dos genes dos fatores de transcrição das vias de sinalização Toll, Imd e Jak/Stat.

Assim como observado nos carrapatos, o silenciamento dos fatores de transcrição não foi específico nas células BME26, o que pode ser explicado por um *cross-talk* entre as vias de sinalização. Esta hipótese deverá ser testada quando for possível identificar as moléculas efetoras de cada via.

Em conclusão, os resultados obtidos até o presente, permitiu ampliar o conhecimento sobre o sistema imune de carrapatos e conseqüentemente compreender melhor a interface *R. microplus* – *A. marginale*.

Referências*

AGAISSE, H.; PETERSEN, UM.; BOUTROS, M.; MATHEY-PREVOT, B.; PERRIMON, N. Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. **Developmental Cell**, v. 5, n. 3, p. 441-450, setembro, 2003.

ANDREOTTI, R. Performance of two Bm86 antigen vaccine formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. **Revista Brasileira de Parasitologia veterinária**, v. 15, n. 3, p. 97-100, 2006

ARMSTRONG, P. B. The contribution of proteinase inhibitors to immune defense. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 1; p. 47-52, janeiro, 2001

AOUN, R. B.; HETRU, C.; TROXLER, L.; DOUCET, D.; FERRANDON, D.; MATT, N. Analysis of thioester-containing proteins during the innate immune response of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 1, p. 52-64, novembro, 2011

BARRÉ, N.; UILENBERG, G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. **Revue scientifique et technique**, v. 29, n. 1, p. 149-160, abril, 2010

BASTOS, R. G., UETI, M. W., GUERRERO, F. D., KNOWLES, D. P., SCOLES, G. A. Silencing of a putative immunophilin gene in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* increases the infection rate of *Babesia bovis* in larval progeny. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. 57, 2009

BELMONTE, R.; CRUZ, C.; PIRES, J.; DAFFRE, S. Purification and characterization of Hb 98-114: A novel hemoglobin-derived antimicrobial peptide from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Peptides**, v. 37, n. 1, p. 120–127, setembro, 2012

BIFANO, T.; UETI, M.; ESTEVES, E.; REIF, K.; BRAZ, G.; SCOLES, G.; BASTOS, R.; WHITE, S.; DAFFRE, S. Knockdown of the *Rhipicephalus microplus* cytochrome c oxidase subunit III gene is associated with a failure of *Anaplasma marginale* transmission. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, maio, 2014

BITEAU, B.; KARPAC, J.; HWANGBO, D.; JASPER, H. Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 5, p. 349-354, maio, 2011

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J. L. HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 23, n. 4-5, p. 329-344, julho, 1999

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 169-184, abril, 2004

BURESOVA, V.; FRANTA, Z.; KOPACEK, P. A comparison of *Chryseobacterium indologenes* pathogenicity to the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, n. 2, p. 96–104, outubro, 2006

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*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 4, p. 489-498, abril, 2009

CDC. Ticks – life cycles. 2013. Disponível em <<http://www.cdc.gov/dpdx/ticks/index.html>> Acessado em: abril de 2016.

CERAUL, S. M.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 376-383, março, 2002

CERAUL, S. M.; DREHER-LESNICK, S. M.; GILLESPIE, J. J., RAHMAN, M. S., AZAD, A. F. New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1973-1983, abril, 2007

CHOU, S.; DAUGHERTY, M. D.; PETERSON, S. B.; BIBOY, J.; YANG, Y.; JUTRAS, B. L.; FRITZ-LAYLIN, L. K.; FERRIN, M. A., HARDING, B. N.; JACOBS-WAGNER, C.; YANG, X. F.; VOLLMER, W.; MALIK, H. S.; MOUGOUS, J. D. Transferred interbacterial antagonism genes augment eukaryotic innate immune function. **Nature**, v. 518, n. 7537, p. 98-101, fevereiro, 2015

CRUZ, C. E.; FOGACA, A. C.; NAKAYASU, E. S.; ANGELI, C. B.; BELMONTE, R.; ALMEIDA, I. C.; MIRANDA, A.; MIRANDA, M. T.; TANAKA, A. S.; BRAZ, G. R.; CRAIK, C. S.; SCHNEIDER, E.; CAFFREY, C. R.; DAFFRE, S. Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. **Parasites & Vectors**, n. 3, p. 63, julho, 2010

DA SILVA VAZ JUNIOR, I.; SEIXAS, A.; MASUDA, A. Pesquisa para uma Vacina contra o Carrapato. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012. Disponível em: <<http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arhrolivro-1/capitulo-17-pesquisa-para-uma-vacina-contra-o-carrapato/view>> Acessado em: abril de 2016.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437-446, outubro, 2012

DE ANDRADE, G.; MACHADO, R.; VIDOTTO, M.; VIDOTTO, O. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, p. 257–266, outubro, 2004

DE LA FUENTE, J.; RODRÍGUEZ, M.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; GARCÍA-GARCÍA, J. C.; MÉNDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDÉS, M.; ENRÍQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUÉ, O.; MACHADO, H.; LLEONART, R. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genetic analysis**, v. 15, n. 3-5, p. 143-148, novembro, 1999

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 275-283, julho, 2006

DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; MANZANO-ROMAN, R.; NARANJO, V.; ALMAZAN, C.; PEREZ DE LA LASTRA, J. M.; ZIVKOVIC, Z.; JONGEJAN, F.; KOCAN, K. M. Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. **Genomics**, v. 90, n. 6, p. 712–722, dezembro, 2007

DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PENA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M., SONENSHINE, D. E. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 6938-6946, maio, 2008

DREHER-LESNICK, S. M.; MULENGA, A.; SIMSER, J. A.; AZAD, A. F. Differential expression of two glutathione S-transferases identified from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 4, p. 445-453, agosto, 2006

EGGENBERGER, L. R.; LAMOREAUX, W. J.; COONS, L. B. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 9, n. 3-4, p. 279-287, outubro, 1990

ESTEVES, E.; LARA, F. A.; LORENZINI, D. M.; COSTA, G. H.; FUKUZAWA, A. H.; PRESSINOTTI, L. N.; SILVA, J. R.; FERRO, J. A.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; DAFFRE, S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 5, p. 568-580, maio, 2008

ESTEVES, E.; FOGAÇA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F. D.; MANSO, P. P.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S. Propagation of a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage in a tick cell line (BME26) derived from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1-2, p. 150-153, 2009

ESTEVES, E.; POHL, P.; KLAFKE, G.; RECK, J.; FOGAÇA, A.; MARTINS, J.; DAFFRE, S. Low temperature affects cattle tick reproduction but does not lead to transovarial

transmission of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 214, n. 3-4, p. 322–326, dezembro, 2015

ERIKS, I. S.; STILLER, D.; GOFF, W. L.; PANTON, M.; PARISH, S. M.; MCELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. Molecular and biological characterization of a newly isolated *Anaplasma marginale* strain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 4, p. 435-441, outubro, 1994

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A Review of the Ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, Their Hosts and Geographic Distribution - 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 4, p. 453-470, julho-agosto, 2000

FARIAS, N. A. R.; GONZALES, J. C.; SAIBRO, J. C. Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, p. 1313-1320, 1986

FERRANDON, D.; IMLER, J. L.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 862–874, novembro, 2007

FOGAÇA, A. C.; DA SILVA, P. I. JR.; MIRANDA, M. T.; BIANCHI, A. G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P. E.; DAFFRE, S. Antimicrobial Activity of a Bovine Hemoglobin Fragment in the Tick *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 36, p. 25330–25334, setembro, 1999

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

FOGAÇA, A. C.; ALMEIDA, I.; EBERLIN, M.; TANAKA, A.; 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**, v. 27, n. 4, p. 667–674, abril, 2006

FUTSE, J. E.; UETI, M. W.; KNOWLES, D. P. JR.; PALMER, G. H. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3829-3834, agosto, 2003

GALAY, R. L.; MAEDA, H.; AUNG, K. M.; UMEMIYA-SHIRAFUJI, R.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; TSUJI, N.; TANAKA, T.; FUJISAKI, K. Anti-babesial activity of a potent peptide fragment derived from longicin of *Haemaphysalis longicornis*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 2, p. 343-348, outubro, 2012

GALLETTI, M. F.; FUJITA, A.; NISHIYAMA, M. Y. JR.; MALOSSI, C. D.; PINTER, A.; SOARES, J. F.; DAFFRE, S.; LABRUNA, M. B.; FOGAÇA, A. C. Natural Blood Feeding and Temperature Shift Modulate the Global Transcriptional Profile of *Rickettsia rickettsii* Infecting Its Tick Vector. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77388, outubro, 2013

GARVER, L.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, G.; BARILLAS-MURY, C. The JNK pathway is a key mediator of *Anopheles gambiae* antiplasmodial immunity. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003622, setembro, 2013

GONZALES, J. C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo, Mestre Jou, 1974. 101p.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, v. 111, p. 927-930, dezembro, 2002

GRISI, L.; LEITE, R.; MARTINS, J.; BARROS, A.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.; VILLELA, H. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 150-156, abril-junho, 2014

GRUNCLOVA, L., FOUQUIER, H., HYPISA, V., KOPACEK, P. Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. **Developmental & Comparative Immunology**, 27, 8, 651-660, setembro, 2003

GUERREIRO, FD., LOVIS, L., MARTINS, JR. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-6, março, 2012

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 28, n. 1-4, p. 27-54, 2010

GUPTA, L.; MOLINA-CRUZ, A.; KUMAR, S.; RODRIGUES, J.; DIXIT, R.; ZAMORA, R. E.; BARILLAS-MURY, C. The STAT pathway mediates late-phase immunity against Plasmodium in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 5, p. 498-507, maio, 2009

HAJDUSEK, O.; SÍMA, R.; AYLLÓN, N.; JALOVECKÁ, M.; PERNER, J.; DE LA FUENTE, J.; KOPACEK, P. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 1-15, julho, 2013

HETRU, C.; HOFFMANN, J. A. NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, p. a000232, outubro, 2009

HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. **Nature Immunology**, v. 3, n. 2, p. 121-126, fevereiro, 2002

HORAK, I. G.; LUTERMANN, H.; MEDGER, K.; APANASKEVICH, D. A.; MATTHEE, C. A. Natural hosts of the larvae of *Nuttalliella* sp. (*N. namaqua?*) (Acari: Nuttalliellidae). The Onderstepoort journal of veterinary research, v. 79, n. 1, p. E1-2, fevereiro, 2012

HOWELL, J. M.; UETI, M. W.; PALMER, G. H.; SCOLES, G. A.; KNOWLES, D. P. Persistently infected calves as reservoirs for acquisition and transovarial transmission of *Babesia bovis* by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3155-3159, outubro, 2007

INOUE, N.; HANADA, K.; TSUJI, N.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 514–519, julho, 2001

JARAMILLO-GUTIERREZ, G.; MOLINA-CRUZ, A.; KUMAR, S.; BARILLAS-MURY, C. The *Anopheles gambiae* Oxidation Resistance 1 (OXR1) Gene Regulates Expression of Enzymes That Detoxify Reactive Oxygen Species. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11168, junho, 2010

JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 9, p. 857-865, julho, 2001a

JOHNS, R.; ONISHI, J.; BROADWATER, A.; SONENSHINE, D. E.; DE SILVA, A.; HYNES, W. L. Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge: Immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 99–107, janeiro, 2001b

KEIRANS, J.; DURDEN, L. Tick Systematics and Identification. In Goodman, J., Dennis, D., Sonenshine, D. Tick-Borne Diseases of Humans. ASM Press, Washington, DC. p.123-140, 2005.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 21, 4, 177-179, outubro-dezembro, 2001.

KLOMPEN, J. S.; BLACK, W. C.; KEIRANS, J. E.; OLIVER, J. H. Jr. Evolution of ticks. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 144-161, 1996

KNOWLES, D.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; PALMER, G.; MCGUIRE, T.; STILLER, D.; MCELWAIN, T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, setembro, 1996

KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Anaplasmosis control. Past, present, and future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 501-509, 2000

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELÉNDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 698-712, outubro, 2003

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; MANZANO-ROMAN, R.; NARANJO, V.; HYNES, W. L.; SONENSHINE, D. E. Silencing expression of the defensin, varisin, in male *Dermacentor variabilis* by RNA interference results in reduced *Anaplasma marginale* infections. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, n. 1-4, p. 17-28, dezembro, 2008

KOCAN, K. M.; ZIVKOVIC, Z.; BLOUIN, E. F.; NARANJO, V.; ALMAZAN, C.; MITRA, R.; DE LA FUENTE, J. Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. **BMC Developmental Biology**, v. 16, n. 9, p. 42, julho, 2009

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 95-107, fevereiro, 2010

KOVAR, V.; KOPACEK, P.; GRUBHOFFER, L. Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 195-205, março, 2000

KOPACEK, P.; VOGT, R.; JINDRAK, L.; WEISE, C.; SAFARIK, I. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 11, p. 989-997, novembro, 1999

KOPACEK, P.; HAJDUSEK, O.; BURESOVA, V.; DAFFRE, S. Tick innate immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 708, p. 137-162, 2010

LABRUNA, M. B.; VERISSÍMO, C. J. Observações sobre a infestação por *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bovinos mantidos em rotação de pastagem, sob alta densidade animal. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 115-120, julho/dezembro, 2001

LAI, R.; TAKEUCHI, H.; LOMAS, L.; JONCZY, J.; RIGDEN, D.; REES, H.; TURNER, P. A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 1, p. 1447-1449, setembro, 2004

LASALA, P. R.; HOLBROOK, M. Tick-borne flaviviruses. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 221-235, março, 2010

LATIF, A. A.; PUTTERILL, J. F.; DE KLERK, D. G.; PIENAAR, R.; MANS, B. J. *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae): first description of the male, immature stages and re-description of the female. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41651, julho, 2012

LECLERC, V.; REICHHART, J. M. The immune response of *Drosophila melanogaster*. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 59-71, abril, 2004

LIU, L.; DAÍ, J.; ZHAO, Y. O.; NARASIMHAN, S.; YANG, Y.; ZHANG, L.; FIKRIG, E. *Ixodes scapularis* JAK-STAT pathway regulates tick antimicrobial peptides, thereby controlling the agent of human granulocytic anaplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 8, p. 1233-1241, outubro, 2012

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dezembro, 2001

MACHADO, A.; SFORCA, M. L.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; MIRANDA, M. T. Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine alpha-hemoglobin: effects on the structure and anticandidal activity. **Biopolymers**, v. 88, n. 3, p. 413-426, 2007

MARMARAS, V. J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. **Cell Signal**, v. 21, p. 186-195, fevereiro, 2009

MATTILA, J. T.; MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. *Rickettsia peacockii*, an endosymbiont of *Dermacentor andersoni*, does not elicit or inhibit humoral immune responses from immunocompetent *D. andersoni* or *Ixodes scapularis* cell lines. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 31, p. 1095-1106, março, 2007

MANS, B. J.; KLERK, D.; PIENAAR, R.; LATIF, A. A. *Nuttalliella namaqua*: A Living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23675, agosto, 2011

MANS, B. J.; DE KLERK, D. G.; PIENAAR, R.; LATIF, A. A. The host preferences of *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae): a generalist approach to surviving multiple host-switches. **Experimental and Applied Acarology**, 62, 2, 233-240, fevereiro, 2014

MASON, C. A.; NORVAL, R. A. I. The transfer of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) from infested to uninfested cattle under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 8, p. 185-188, 1981

MIRANPURI, G. S. Ticks parasitising the Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) and their possible role in disease transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 27, n. 3-4, p. 357-362, março, 1988

MULENGA, A.; MACALUSO, K. R.; SIMSER, J. A.; AZAD, A. F. Dynamics of *Rickettsia*-tick interactions: identification and characterization of differentially expressed mRNAs in uninfected and infected *Dermacentor variabilis*. **Insect Molecular Biology**, v. 12, n. 2, p. 185-193, abril, 2003

NAKAJIMA, Y.; OGIHARA, K.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 1, p. 78-81, janeiro, 2003

NARASIMHAN, S.; SUKUMARAN, B.; BOZDOGAN, U.; THOMAS, V.; LIANG, X.; DEPONTE, K.; MARCANTONIO, N.; KOSKI, R. A.; ANDERSON, J. F.; KANTOR, F.; FIKRIG, E. A tick antioxidant facilitates the Lyme disease agent's successful migration from the mammalian host to the arthropod vector. **Cell Host & Microbe**, v. 2, p. 7-18, julho, 2007

NARASIMHAN, S.; FIKRIG, E. Tick microbiome: the force within. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 7, p. 315-323, abril, 2015

NARASIMHAN, S.; RAJEEVAN, N.; LIU, L.; ZHAO, Y. O.; HEISIG, J.; PAN, J.; EPPLER-EPSTEIN, R.; DEPONTE, K.; FISH, D.; FIKRIG, E. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 1, p. 58-71, janeiro, 2014

NEELAKANTA, G.; SULTANA, H.; FISH, D.; ANDERSON, J. F.; FIKRIG, E. *Anaplasma phagocytophilum* induces *Ixodes scapularis* ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 9, p. 3179-3190, setembro, 2010

NIJHOF, A. M.; BALK, J. A.; POSTIGO, M.; JONGEJAN, F. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. **BMC Molecular Biology**, v. 10, p. 112, dezembro, 2009

NOVAS, J. C. V. Anaplasmosse bovina. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite-CNPGL Coronel Pacheco-MG. Boletim de Pesquisa nº 06. Março, 1982. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/143029/1/2049.pdf>> Acessado em: junho de 2016

NYANGIWE N.; HORAK, I. G. Goats as alternative hosts of cattle ticks. The Onderstepoort **Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 1, p. 1-7, março, 2007

PEDRA, J.; NARASHIMHAN, S.; RENDIĆ, D.; DEPONTE, K.; BELL-SAKYI, L.; WILSON, I.; FRIKING, E. Fucosylation enhances colonization of ticks by *Anaplasma phagocytophilum*. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 1222-1234, setembro, 2010

PEREIRA, L.; OLIVEIRA, P.; BARJA-FIDALGO, C.; DAFFRE, S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 66-72, outubro, 2001

PICHU, S.; RIBEIRO, J.; MATHER, T. Purification and characterization of a novel salivary antimicrobial peptide from the tick, *Ixodes scapularis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 3, p. 511–515, dezembro, 2009

PINTER, A.; LABRUNA, M. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 523–529, outubro, 2006

PRUETT, J. H. Immunological control of arthropod ectoparasites - a review. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 25-32, janeiro, 1999

RECK, J. Controle do carrapato bovino no ambiente (nas pastagens). Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/nespro/arquivos/workshop_carrapato/controle_carrap_bov_ambiente.pdf> Acessado em:16/09/2016

REEVES, M. A.; HOFFMANN, P. R. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p.2457-2478, agosto, 2009

REGO, R.; HAJDUSEK, O.; KOVÁR, V.; KOPÁČEK, P.; GRUBHOFFER, L.; HYPŠA, V. Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 35, 9, 991–1004, setembro, 2005

REGO, R.; KOVÁR, V.; KOPÁČEK, P.; WEISE, C.; MAN, P.; SAUMAN, I.; GRUBHOFFER, L. The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibrinogen-related molecule. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 291–299, abril, 2006

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 73-88, junho, 2003

RIBEIRO, M. F. B.; FACURY-FILHO, E. J.; PASSOS, L. M. F.; SATURNINO, H. M.; MALACCO, M. A. F. Uso de inóculo padronizado de *Anaplasma marginale* e da quimioprofilaxia no controle da anaplasmoze bovina. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 55, n.1, p. 21-26, fevereiro, 2003

ROSA, R.; CAPELLI-PEIXOTO, J.; MESQUITA, R.; KALIL, S.; POHL, P.; BRAZ, G.; FOGAÇA, A. C.; DAFFRE, S. Exploring the immune signalling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: From molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 59, p. 1-14, junho, 2016

ROSA, R. D.; DE LORGERIL, J.; TAILLIEZ, P.; BRUNO, R.; PIQUEMAL, D.; BACHÈRE, E. A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. **BMC Genomics**, v. 13, p. 252, junho, 2012

ROSA DE LIMA, M. F.; SANCHEZ FERREIRA, C. A.; JOAQUIM DE FREITAS, D. R.; VALENZUELA, J. G.; MASUDA, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 747-754, julho, 2002

ROYET, J.; MEISTER, M.; FERRANDON, D. **Humoral and cellular responses in *Drosophila* innate immunity**. In: Innate Immunity. Ed R. A. B. Ezekowitz and J. A. Hoffmann. Humana Press Inc, Totowa, 2003

RYU, J. H.; KIM, S. H.; LEE, H. Y.; BAI, J. Y.; NAM, Y. D.; BAE, J. W.; LEE, D. G.; SHIN, S. C.; HA, E. M.; LEE, W. J. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. **Science**, v. 319, n. 5864, p. 777-782, fevereiro, 2008

SACCO, A. M. S.; KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R. Cepas atenuadas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e de *Anaplasma centrale* como imunógenos no controle da tristeza parasitária bovina. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 849-855, setembro, 2001

SACCO, A. M. S. Controle de surtos de Tristeza Parasitária Bovina. **Circular Técnica, Embrapa Pecuária Sul**, Bagé, RS, v. 26. 2002

SEABRA-JUNIOR, E. S.; SOUZA, E. M.; MESQUITA, R. D. FAT - Functional Analysis Tool. INPI. Brasil; RS11083-6, 2011

SCOLES, G. A.; UETI, M. W.; NOH, S. M.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Conservation of transmission phenotype of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains among *Dermacentor* and *Rhipicephalus* ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 44, p. 484-491, 2007

SFORCA, M. L.; MACHADO, A.; FIGUEREDO, R. C.; OYAMA, S.; SILVA, F. D.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MIRANDA, M. T. M.; SPISNI, A.; PERTINHEZ, T. A. The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. **Biochemistry**, v. 44, n. 17, p. 6440-6451, maio, 2005

SHIMADA, M. K.; YAMAMURA, M. H.; KAWASAKI, P. M.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in larvae of *Boophilus microplus* ticks by polymerase chain reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 1026, p. 95-102, 2004

SILVA, F.; REZENDE, C.; ROSSI, D.; ESTEVES, E.; DYSZY, F.; SCHREIER, S.; DAFFRE, S. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating

antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 50, p. 34735-34746, dezembro, 2009.

SMITH, A.; PAL, U. Immunity-related genes in *Ixodes scapularis* - perspectives from genome information. **Frontiers in cellular and infection Microbiology**, v. 4, p. 116, agosto, 2014.

SMITH, A. A.; NAVASA, N.; YANG, X.; WILDER, C. N.; BUYUKTANIR, O.; MARQUES, A.; ANGUIA, J.; PAL, U. Cross-Species Interferon Signaling Boosts Microbicidal Activity within the Tick Vector. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 1, p. 91-98, 2016

SOUZA-NETO, J. A.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. **PNAS**, v. 106, n. 42, p. 17841-17846, outubro, 2009

SONENSHINE, D. E. **Biology of Ticks**, vol 1. New York: Oxford University Press, 1991

SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L.; CERAUL, S. M.; MITCHELL, R.; BENZINE, T. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, n. 3, p. 207-223, 2005

SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 7046-7063, maio, 2008

STEVENS, V.; PATEL, A.; FEIGELSON, H.; RODRIGUEZ, C.; THUN, M.; CALLE, E. Cryopreservation of whole blood samples collected in the field for a large epidemiologic study. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research**, v. 16, p. 2160-2163, outubro, 2007

SUAREZ, C. E.; NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 109-125, agosto, 2011

SUKUMARAN, B.; NARASIMHAN, S.; ANDERSON, J.; DEPONTE, K.; MARCANTONIO, N.; KRISHNAN, M.; FIKRIG, E. An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 6, p. 1507-1517, junho, 2006

TSUJI, N.; BATTSETSEG, B.; BOLDBAATAR, D.; MIYOSHI, T.; XUAN, X.; OLIVER, J. H.; FUJISAKI, K. Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 7, p. 3633-3640, julho, 2007

TSUJI, N.; FUJISAKI, K. Longicin plays a crucial role in inhibiting the transmission of *Babesia* parasites in the vector tick *Haemaphysalis longicornis*. **Future Microbiology**, v. 2, p. 575-578, dezembro, 2007

URBANOVÁ, V.; SÍMA, R.; SAUMAN, I.; HAJDUSEK, O.; KOPACEK, P. Thioester-containing proteins of the tick *Ixodes ricinus*: gene expression, response to microbial challenge and their role in phagocytosis of the yeast *Candida albicans*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 48, n. 1, p. 55-64, janeiro, 2015

VALANNE, S.; WANG, J. H.; RÄMET, M. The *Drosophila* Toll signaling pathway. **The Journal of Immunology**, 186, 2, 649-656, janeiro, 2011

VERÍSSIMO, C. J. Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. Revista de educação continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 11, n. 1, p. 14-23, 2013

VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; MACHADO, R. Z.; ROCHA, M. A.; SILVA, S. S. Performance of a vaccine containing *Anaplasma centrale* and attenuated strains of *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* against bovine babesioses and anaplasmosis. **Revista Semina: Ciências Agrárias** - Universidade Estadual de Londrina, v. 19, n. 1, p. 26-30, 1998

VIDOTTO, O. Estratégias de combate aos principais parasitas que afetam os bovinos. Anais do Sul-Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil / editores Geraldo Tadeu dos Santos et al. – Maringá: UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002. P. 212. Artigo encontra-se nas páginas 192-212

Xi, Z.; Ramirez, J. L.; Dimopoulos, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. **PLoS Pathogen**, v. 4, n. 7, p. e1000098, julho, 2008

WEISS, B. L.; WANG, J.; MALTZ, M. A.; WU, Y.; Aksoy, S. Trypanosome infection establishment in the tsetse fly gut is influenced by microbiome-regulated host immune barriers. **PLoS Pathogen**, v. 9, p. e1003318, 2013

ZEIDLER, M. P.; BACH, E. A.; PERRIMON, N. The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway. **Oncogene**, v. 19, p. 2598-2606, 2000

Apêndices



Exploring the immune signalling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: From molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge



Rafael D. Rosa^{a,1}, Janaína Capelli-Peixoto^a, Rafael D. Mesquita^b, Sandra P. Kalil^a, Paula C. Pohl^a, Glória R. Braz^b, Andrea C. Fogaça^a, Sirlei Daffre^{a,*}

^a Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-909 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2015

Received in revised form

21 December 2015

Accepted 22 December 2015

Available online 24 December 2015

Keywords:

Innate immunity

Tick

Signalling pathway

Rhipicephalus microplus

Anaplasma marginale

ABSTRACT

In dipteran insects, invading pathogens are selectively recognized by four major pathways, namely Toll, IMD, JNK, and JAK/STAT, and trigger the activation of several immune effectors. Although substantial advances have been made in understanding the immunity of model insects such as *Drosophila melanogaster*, knowledge on the activation of immune responses in other arthropods such as ticks remains limited. Herein, we have deepened our understanding of the intracellular signalling pathways likely to be involved in tick immunity by combining a large-scale *in silico* approach with high-throughput gene expression analysis. Data from *in silico* analysis revealed that although both the Toll and JAK/STAT signalling pathways are evolutionarily conserved across arthropods, ticks lack central components of the *D. melanogaster* IMD pathway. Moreover, we show that tick immune signalling-associated genes are constitutively transcribed in BME26 cells (a cell lineage derived from embryos of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*) and exhibit different transcriptional patterns in response to microbial challenge. Interestingly, *Anaplasma marginale*, a pathogen that is naturally transmitted by *R. microplus*, causes downregulation of immune-related genes, suggesting that this pathogen may manipulate the tick immune system, favouring its survival and vector colonization.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ticks (phylum Arthropoda; subphylum Chelicerata; class Arachnida; subclass Acari; family Ixodidae) are blood-feeding arthropods that transmit a wide variety of bacteria, protozoa, viruses and helminths to human and animals (Sonenshine and Roe, 2014). Rickettsial diseases are among the most severe diseases transmitted by ticks and are caused by various species of gram-negative obligate intracellular bacteria (Dantas-Torres et al., 2012; Parola et al., 2005). Bovine anaplasmosis is a tick-borne rickettsial disease caused by *Anaplasma marginale* (order Rickettsiales; family Anaplasmataceae). Various tick species can transmit this bacterium

to bovines around the world, but in South America, including Brazil, its main tick vector is *Rhipicephalus microplus* (Aubry and Geale, 2011; Kocan et al., 2010). *R. microplus* is a one-host tick and one of the most important ectoparasites of cattle, being responsible for severe economic impact on agricultural systems globally, transmitting an extensive list of etiological agents of bovine diseases, including babesiosis (caused by intraerythrocytic protozoa in the genera *Babesia*, such as *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*) and anaplasmosis (caused by the intraerythrocytic bacteria *A. marginale*) (Kocan et al., 2010). Clinical manifestations of babesiosis are frequently characterized by fever, lethargy, anemia, hemoglobinemia, hemoglobinuria, and jaundice (Pérez de Leon et al., 2014). Anaplasmosis clinical manifestations are similar to the babesiosis disease but without hemoglobinemia and hemoglobinuria (Gaff et al., 2014). The economic losses are associated with reductions in milk and meat production, temporary infertility (and abortion), treatment costs and high animal mortality in enzootic areas (Kocan et al., 2010). In Brazil, the economic losses

* Corresponding author.

E-mail address: sidaffre@icb.usp.br (S. Daffre).

¹ Present address: Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

due to *R. microplus* are highly significant, being estimated at around USD 3.24 billion per year (Grisi et al., 2014).

When a pathogen is acquired from an infected host by a tick during blood feeding, it has to overcome several tissue barriers (midgut, haemocoel, salivary glands) and resist the tick's innate immune responses to be successfully transmitted to another host (Hajdusek et al., 2013; Kopacek et al., 2010). Indeed, the innate immune response is the first line of defence against microbial infections in animals (Hoffmann et al., 1999). The tick's innate immune system, like in other invertebrates, is composed of both cellular and humoral immune responses that recognize pathogens and act against them in an orchestrated manner. The cellular responses are mostly represented by phagocytosis, encapsulation and nodulation of foreign particles, while the humoral responses include a variety of pattern-recognition proteins and effector molecules such as the complement-like system [composed of thioester-containing proteins (TEP)], lectins, antimicrobial peptides (AMPs), and reactive oxygen species (ROS) (Hajdusek et al., 2013; Kopacek et al., 2010; Smith and Pal, 2014; Sonenshine and Hynes, 2008).

Transcription of AMPs and other effectors that compose the immune system of several insects of the order Diptera is selectively triggered by microorganisms through activation of the Toll, IMD (immune deficiency), JNK (Jun-N-terminal kinase) or JAK/STAT (Janus kinase/signalling transducer and activator of transcription) pathway. For instance, the Toll pathway is triggered by gram-positive bacteria and fungi in *Drosophila melanogaster* (Lemaitre, 2004) and by viruses in the mosquito *Aedes aegypti* (Xi et al., 2008), culminating in the expression of specific AMPs. The IMD pathway is activated by diaminopimelic acid (DAP)-type peptidoglycan (PGN), which is present in the cell wall of most gram-negative bacteria and some gram-positive bacteria, triggering the synthesis of specific AMPs (Kleino and Silverman, 2014). The activation of one specific complex in the IMD pathway, the TAK1/TAB2 complex, can alternatively lead to the activation of the JNK pathway (Silverman et al., 2003). Apparently, this pathway does not induce the transcription of AMP coding genes. In *Drosophila*, JNK signalling has been shown to be involved in a wide range of biological processes including embryonic development, apoptosis, stress response, cell proliferation and differentiation, and immunity (Kockel et al., 2001). Conversely, the JAK/STAT pathway can be induced by microbial or viral stimulation in mosquitoes and has also been implicated in the control of *Plasmodium* (Bahia et al., 2011; Gupta et al., 2009).

Even though the immune signalling pathways are well understood in insects, very little is known about them in ticks (Hajdusek et al., 2013; Severo et al., 2013; Smith and Pal, 2014). Elucidation of the genome of *Ixodes scapularis* allowed some components of tick immune pathways to be identified (Severo et al., 2013; Smith and Pal, 2014), but functional data about the activation of immune signalling pathways and the control of tick-borne pathogens are scarce. It was previously shown that the JAK/STAT pathway from the tick *I. scapularis* is likely involved in the control of infection by both *Anaplasma phagocytophilum* (Liu et al., 2012) and *Borrelia burgdorferi* (Narasimhan et al., 2014). In addition, it was hypothesized that transcription of the factor Relish/NF- κ B from the IMD pathway may be involved in regulating the expression of subolesin (orthologue of insect akirins), which was tested as a vaccine against ticks (de la Fuente et al., 2011). Interestingly, the importance of ubiquitination during colonization of *I. scapularis* by *A. phagocytophilum* has been shown, but the link between ubiquitination and immune signalling pathways is not completely clear (Severo et al., 2013).

In the current study, we used an *in silico* large-scale approach to identify components from the tick Toll, IMD and JAK/STAT

signalling pathways. In addition, we analysed the phylogenetic relationships of the identified components with homologous sequences from other arthropods. We also determined the gene expression profile of *R. microplus* immune signalling pathway-associated genes in BME26 cells (Esteves et al., 2009, 2008) exposed to microbial challenges, including one naturally transmitted pathogen, *A. marginale*. The acquired knowledge about the biology of the tick and its interaction with pathogens may be useful in controlling ticks and tick-borne diseases.

2. Materials and methods

2.1. *In silico* identification and annotation of immune signalling pathways in ticks

The information on coding sequences of *R. microplus* that is publicly available is very limited. There are only 52,901 ESTs deposited in Gene Bank (Benson et al., 2013) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), and most of them are un-annotated fragments. In relation to annotated proteins, there are no more than 962 sequences deposited in Gene Bank so far. As this scenario is not favourable for finding complete coding sequences of *R. microplus*, in the current study, we used unpublished data from an Illumina-based transcriptome databank from seven organs (ovary, synganglion, salivary gland, fat body, digestive cells) of naïve *R. microplus*, acquired at various stages of development (embryo, semi-engorged and engorged female). The resulting reads were deposited in NCBI (Biosample SAMN02463642 and Bioproject PRJNA232001). These reads were then assembled into contigs using a series of programs mastered by in-house software designed by J.M.C. Ribeiro (NIH/NIAID) (Ribeiro et al., 2011). These contigs were further annotated, and a databank, which will be made public in a forthcoming publication, is available to our associates. Sequences of other tick species (*Amblyomma cajennense*, *Amblyomma maculatum*, *Amblyomma variegatum*, *Ixodes ricinus*, *I. scapularis*, and *Rhipicephalus pulchellus*) deposited in Gene Bank were also obtained and used to generate a tick databank.

Protein sequences of components of the *D. melanogaster* immune signalling pathways were obtained through the downloadable hyperlinked spreadsheet "List of *Drosophila* genes potentially involved in the immune response" available at <http://lemaitrelab.epfl.ch/page-7767-en.html>. The conserved domains present in those proteins were used by FAT software (Seabra-Junior et al., 2011) to select potentially homologous sequences from the tick databank and automatically annotate them. FAT uses both sequence similarity and presence of conserved domains for annotation based on the results of BLAST against both the nr and Swiss-prot uniprot databases and also on HMMSCAN against the Pfam database (Finn et al., 2014). As non-identified immune-related genes could still be in the transcriptome as fragments or truncated proteins without any conserved domain, we performed tblastn searches. Analyses were performed using sequences from tick-related organisms (insects, including *D. melanogaster*, chelicerates and crustaceans) as queries to improve the chances of finding tick immune-related genes. Sequences identified by the tblastn analyses were extracted using a custom script, and automatic annotation was performed as described above. All results were further manually inspected.

2.2. Molecular cloning

Sequences encoding Rel/NF- κ B transcription factor 1 (Dorsal/Rel1) and inhibitor of NF- κ B (I κ B/Cactus) of *R. microplus* were obtained by conventional PCR using primers (Appendix A) designed to match the consensus nucleotide sequences of *I. scapularis* (Dorsal: XP_002399379; Cactus: EEC10897), *I. ricinus* (Dorsal: JAC92732)

and *R. pulchellus* (Cactus: JAA63663; JAA58989). PCR reactions were conducted in a 25 μ L reaction volume using 1 μ L of cDNA as template (see Section 2.6). The PCR conditions were as follows: 30 cycles of 94 °C for 1 min, 56 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and a final elongation step of 72 °C for 10 min. The amplification products were cloned into a pGEM-T Easy vector using the standard TA cloning procedure (Promega). Positive recombinant clones were identified by colony PCR and were sequenced in both directions.

2.3. Homology and phylogenetic analyses

Homology searches using amino sequences from the identified signalling pathway components were performed using BLAST at NCBI. The sequences were aligned using MUSCLE (Edgar, 2004). The simple modular architecture research tool (SMART; <http://smart.embl-heidelberg.de>), NCBI Conserved Domain Database (CDD; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) and the InterProScan Sequence Search (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/sequence-search>) were used to analyse the domain structure of the immune signalling pathway proteins. Phylogenetic analysis was performed using the Phylogeny Reconstruction with Maximum Likelihood as the statistical method within the software MEGA version 6.0 (Tamura et al., 2013). Bootstrap sampling was reiterated 1000 times.

2.4. Tick cell line culture

The embryonic cell line BME26, derived from the cattle tick *R. microplus*, was cultured as adherent monolayers in L-15B300 medium supplemented with 5% heat-inactivated foetal bovine serum, 10% Tryptose Phosphate Broth, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin, and 0.1% bovine lipoprotein concentrate (pH 7.2). The cells were grown in an incubator at 34 °C in the absence of CO₂ as previously described (Esteves et al., 2008). Cell growth and viability were assessed by optical microscopy after trypan blue staining.

2.5. Microorganisms and immune challenge assays

BME26 cells were experimentally challenged with the gram-positive bacterium *Micrococcus luteus* (ATCC 9341A), the gram-negative bacterium *Enterobacter cloacae* K12 provided by Dr. Hans G. Boman from Stockholm University (Sweden), the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 208353) and the rickettsiae *Anaplasma marginale* (Jaboticabal strain) (de Andrade et al., 2004) and *Rickettsia rickettsii* (Taiacau strain) (Pinter and Labruna, 2006). *M. luteus* ATCC 9341A and *E. cloacae* K12 were grown in LB medium at 37 °C, and the yeast *S. cerevisiae* ATCC 208353 was cultured at 30 °C in yeast peptone dextrose medium. After overnight incubation, microorganisms were washed twice in PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4.) and heat-killed by incubation at 75 °C for 30 min. *A. marginale* and *R. rickettsii* were obtained from infected bovine blood and BME26, respectively, as described hereafter. Frozen stabilities of *A. marginale*-infected bovine blood prepared as previously described (Stevens et al., 2007) were defrosted in a water-bath at 37 °C and centrifuged at 3000 \times g for 10 min at 4 °C. The pellet was washed twice in PBS at 3000 \times g for 10 min at 4 °C. The final pellet containing bacteria and cellular debris was suspended in PBS (*A. marginale* inoculum) and used for BME26 cell infection. Non-infected bovine blood was prepared as described for *A. marginale*-infected blood and used as a control (bovine blood cell debris). Frozen *R. rickettsii*-infected BME26 cells prepared as described previously (Munderloh et al., 1994) were defrosted in a water-bath at 37 °C and inoculated into BME26 cells. Infection-free BME26 cells were prepared as detailed

for *R. rickettsii*-infected cells and used as a control (lysed BME26 cells).

Prior to immune challenge, 1.5×10^6 BME26 cells were subcultured into flasks and incubated for 3 days at 34 °C for adherence and recovery. For bacterial challenge, cells were incubated with 100 heat-killed bacteria per BME26 cell, and for yeast challenge, cells were incubated with 5 heat-killed yeast per BME26 cell. For rickettsial infections, BME26 cells were incubated with *A. marginale* inoculum (941 *A. marginale* per BME26 cell or 1.4×10^9 *A. marginale* per flask) or *R. rickettsii* inoculum (3.3×10^{-2} *R. rickettsii* per BME26 cell or 4.9×10^4 *R. rickettsia* per flask). BME26 cells incubated with sterile PBS, bovine blood cell debris and lysed BME26 cells were used as controls. After 6, 24 and 72 h post-challenge, cells were harvested by centrifugation at 500 \times g for 10 min at 4 °C and directly processed for genomic DNA and total RNA extraction.

2.6. RNA and DNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from BME26 cells using TRIzol[®] reagent (Invitrogen). The resulting RNA was treated with DNase I (Invitrogen) to eliminate contaminating genomic DNA. After precipitation with 0.3 M sodium acetate and isopropyl alcohol (1:1 v/v), the RNA concentration was determined in a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). RNA integrity was analysed by agarose electrophoresis. Following heat denaturation (70 °C for 5 min), reverse transcription in complementary DNA (cDNA) was performed using 1 μ g of purified total RNA as template in a 20 μ L reaction volume containing 2.5 μ M oligo(dT)_{12–18}, 0.5 mM dNTPs, 5 mM DTT, 2 units of RNaseOUT Ribonuclease and 10 units of SuperScript III reverse transcriptase, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

Genomic DNA (gDNA) was extracted from BME26 cells using Smarter Nucleic Acid Sample Preparation (STRATEC Molecular, Berlin, Germany) according to the manufacturer's instructions.

2.7. Quantification of *A. marginale* and *R. rickettsii* by real-time quantitative PCR (qPCR)

The total number of rickettsiae in BME26 cells was determined by qPCR using specific primers and a hydrolysis probe for genes encoding major surface protein 5 (*mSP5*) of *A. marginale* and citrate synthase of *R. rickettsii* as detailed by (Bifano et al., 2014) and (Galletti et al., 2013), respectively.

2.8. High-throughput microfluidic RT-qPCR

The gene expression profile of components of the immune signalling pathways of *R. microplus* in BME26 cells was determined using the microfluidic high-throughput RT-qPCR platform BioMark™ (Fluidigm 96.96 dynamic array systems) (Kellogg et al., 2014; Spurgeon et al., 2008). Specific primer pairs for each gene were manually designed. The primer design parameters included primer melting temperature ranging from 58 °C to 62 °C, primer length ranging from 20 to 21 bp, primer G/C content approximately 50% and amplicon length ranging from 100 bp to 200 bp. Details of all primers used in this study are listed in Appendix A. Potential self-complementarity and primer-dimer formation were checked using FastPCR Professional software (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>).

Total RNA was extracted from both experimentally infected and uninfected BME26 cells as described above, and reverse transcription was performed using 250 ng of purified total RNA. In order to increase the number of cDNA templates, a supplementary step of preamplification was performed using 2.5 μ L of cDNA, 2.5 μ L of a

mixture of forward and reverse primers (200 nM each) specific for each analysed gene (Appendix A) and 5 μ L of 2 \times TaqMan[®] PreAmp Master Mix (Applied Biosystems). The PCR cycling conditions were as follows: polymerase activation at 95 °C for 10 min, followed by 14 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 4 min.

Primer reaction mixtures were performed in a final volume of 5 μ L containing 2.5 μ L of 2 \times Assay Loading Reagent (Fluidigm), 1.25 μ L of 20 μ M forward and reverse primer mix and 1.25 μ L of TE buffer (10 mM Tris base, 1 mM EDTA pH 7.5). The sample reaction mixtures were made in the same volume of 5 μ L containing 1.25 μ L of pre-amplified cDNA (diluted 1:5 in TE buffer), 2.5 μ L of 2 \times TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 0.25 μ L of 20 \times DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm), 0.25 μ L of 20 \times EvaGreen (Biotium) and 0.75 μ L of TE buffer. Both sample and primer reaction mixtures were loaded into the dynamic array chip, which was subsequently placed on the NanoFlex™ 4-IFC Controller for loading and mixing. After approximately 50 min, the chip was transferred to the BioMark™ Real-Time PCR System. The cycling programme used was as follows: 10 min at 95 °C followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 1 min at 60 °C. The specificity of the RT-qPCR product was determined by melting curve analysis, which was performed after RT-qPCR completion by collecting fluorescence between 60 and 95 °C at 0.5 °C increments. Primer efficiency was verified for all primer sets by using different concentrations of cDNA (five twofold dilutions) and monitoring amplification by RT-qPCR.

2.9. Relative gene expression calculation

Gene expression data were analysed using the BioMark™ Real-time PCR analysis software (Fluidigm) to obtain quantification cycle (Cq) values. The 40S ribosomal protein S3a (TIGR: TC17690), malate dehydrogenase (TIGR: TC16610), glutamate dehydrogenase (TIGR: TC17387) and cytochrome c oxidoreductase (TIGR: TC15406) were used as endogenous reference genes. The results are presented as changes in relative expression in infected cells versus control cells normalized to the geometric mean of the Cq values of the four reference genes using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method as described (Livak and Schmittgen, 2001). Global analysis of gene expression was performed with Multiple Viewer software version 4.6.2 (<http://www.tm4.org/mev/>).

3. Results

3.1. Tick immune signalling pathway gene discovery by comparative genomic and transcriptomic analyses

Results from *in silico* analyses led to the identification of 122 putative proteins possibly involved in signal transduction through the Toll, IMD and JAK/STAT pathways in seven tick species: *A. cajennense*, *A. maculatum*, *A. variegatum*, *I. ricinus*, *I. scapularis*, *R. pulchellus* and *R. microplus* (Table 1). These sequences include both single- and multi-domain molecules, such as transmembrane receptors, ligand receptors, enzymes involved in ubiquitination, adaptor molecules, transcription factors and inhibitor proteins. All nucleotide sequences of *R. microplus* that were annotated by the *in silico* analysis or molecular cloning were submitted to GenBank under accession no. KF828741–KF828780.

Subsequently, we manually mapped the resulting homologous sequences in the three main Toll, IMD and JAK/STAT pathways of invertebrates. Both the Toll and JAK/STAT pathways showed more conservation within arthropods than the IMD pathway (Fig. 1).

3.2. The Toll signalling pathway

Results from our *in silico* analyses revealed that all downstream components of the Toll signalling pathway of arthropods are conserved in ticks. We identified 10 of the 12 downstream members of the *Drosophila* Toll pathway in the *R. microplus* transcriptome dataset. Only the Rel/NF-kappa B transcription factor Dorsal and its inhibitor protein, IkkappaB Cactus, were not found. However, orthologues of those *Drosophila* genes were identified by screening their nucleotide sequences against *I. ricinus*, *I. scapularis* and *R. pulchellus* data available in GenBank (Fig. 1A). Using consensus specific primer sets on cDNA from BME26 cells, we cloned and sequenced both Dorsal Rel/NF- κ B (GenBank: KF828755) and Cactus I κ B (GenBank: KF828754) homologues from *R. microplus*. We identified sequences encoding the extracellular cytokine Spätzle (Spz), the transmembrane cytokine receptor Toll, Toll-interacting protein (TOLLIP), the adaptor protein MyD88, the kinases Tube (interleukin-1 receptor-associated kinase 4 or IRAK4) and Pelle (interleukin-1 receptor-associated kinase 1 or IRAK1), the Pelle-interacting protein Pellino, tumour necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs), the evolutionarily conserved signalling intermediate in toll pathway (ECSIT), the sterile alpha- and armadillo-motif-containing protein (SARM), and the interacting protein Cactin of the NF- κ B inhibitor Cactus (I κ B) (Fig. 1A).

The structural domains of the tick Toll-associated proteins are presented in Table 1. Only one representative sequence or variant was identified for most of the Toll pathway members. Interestingly, the results showed that ticks seem to have different Toll receptors and Spz cytokines. The full-length Toll receptor sequences identified in ticks consisted of a signal peptide followed by a mature protein comprised of an N-terminal extracellular domain containing leucine-rich repeats (LRR), a transmembrane (TM) domain and a cytoplasmic Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain at the C-terminal region (Table 1). Phylogenetic analysis clustered the tick Tolls into two different clades. The first group, which includes one Toll from *R. microplus* (GenBank: AIT40186) and one Toll from *I. scapularis* (GenBank: EEC04824), is closely related to those from chelicerates (horseshoe crabs), crustaceans and DmToll-1, DmToll-3, DmToll-4, and DmToll-5 from *D. melanogaster* and related insect species (*Anopheles gambiae*, *A. aegypti*, *Bombus terrestris*, *Nasonia vitripennis* and *Tribolium castaneum*). The second group includes a Toll from *R. microplus* (GenBank: AIT40187) and two Tolls from *I. scapularis* (GenBank: EEC14202; EEC15829), which cluster with *D. melanogaster* DmToll-2 (d18Wheeler), DmToll-6, DmToll-7, and DmToll-8, LvToll-3 from the penaeid shrimp *Litopenaeus vannamei* and a Toll from the body louse *Pediculus humanus corporis* (Fig. 2A). Interestingly, this group appeared to be more related to human Toll-like receptors (hTLR-1 to hTLR-10) and *Drosophila* DmToll-9 than to the other invertebrate Toll receptors (Fig. 2A).

No obvious M/PAMP-binding insertions were identified in the LRR of tick Toll receptors, suggesting that they do not function as pattern recognition proteins. Thus, as observed in other invertebrates, it is possible that tick Toll receptors are mainly cytokine receptors that recognize the ligand Spz. We identified at least nine different Spz-like sequences across three tick species, four sequences from *I. scapularis*, two from *I. ricinus*, and three ones from *R. microplus* (Table 1; Fig. 2B). Like other invertebrate Spz cytokines, tick Spz consists of a signal peptide followed by a mature protein containing a putative C-terminal cysteine-knot (CKnot) domain. Interestingly, we found a Coagulin domain (COAG; pfam: 02035) in the C-terminal region of three tick Spz members (*I. ricinus*: JAB81606; *I. scapularis*: EEC08728; *R. microplus*: AIT40184). A phylogenetic tree was constructed with the deduced amino acid sequences of the obtained tick Spz and Spz homologues from other arthropod species. Spz-like sequences from ticks clustered into

Table 1
Structural domains of tick immune signalling-associated proteins.

Gene	Tick	Database [Number]	Structural domains
<i>Toll pathway</i>			
Spätzle cytokine	<i>I. ricinus</i>	GenBank [JAB80481] GenBank [JAB81606]	CKnot CKnot; COAG
	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC17543] GenBank [EEC16960] GenBank [EEC06491] GenBank [EEC08728]	CKnot CKnot CKnot CKnot; COAG
	<i>R. microplus</i>	GenBank [CK178263] GenBank [AIT40184] GenBank [AIT40185]	CKnot CKnot; COAG CKnot
Toll receptor	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC04824]	LRR; LRR-CT; LRR-NT; TM; TIR
	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC14202]	
	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC15829]	
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40186]	
MyD88	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC12280]	DD; TIR
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40188]	
	<i>R. pulchellus</i>	GenBank [JAA61877]	
Tube (IRAK4)	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC09977]	DD; S_TKc
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40190]	
Pelle (IRAK1)	<i>I. ricinus</i>	GenBank [JAB81555]	DD; S_TKc
	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC01388]	
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40191]	
Pellino	<i>I. ricinus</i>	GenBank [JAB79402]	PEL
	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC13369]	
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40192]	
	<i>R. pulchellus</i>	GenBank [JAA57628]	
TOLLIP	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC04015]	C2; CUE
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40189]	
SARM	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC13773]	SAM; AMR, TIR
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40193]	
	<i>R. pulchellus</i>	GenBank [JAA63634]	
ECSIT	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC11820]	ECSIT; ECSIT_Cterm
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40195]	
	<i>R. pulchellus</i>	GenBank [JAA56055]	
TRAF	<i>A. cajennense</i>	GenBank [JAC21568]	RING; MATH
	<i>A. maculatum</i>	GenBank [AEO36681]	
	<i>I. ricinus</i>	GenBank [JAC92120]*	
	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC19151]*	
	<i>R. microplus</i>	TIGR [TC24880]	
	<i>R. pulchellus</i>	GenBank [JAA54541]	
Cactin	<i>A. cajennense</i>	GenBank [JAC22325]	CactinC_cactus; Cactin_mid
	<i>A. maculatum</i>	GenBank [AEO36842]	
	<i>I. ricinus</i>	GenBank [JAB83981]	
	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC06953]	
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40194]	
	<i>R. pulchellus</i>	GenBank [JAA58196]	
Cactus (IkB)	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC10897]	ANK (× 5)
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40196]	
	<i>R. pulchellus</i>	GenBank [JAA63663]	
Dorsal (Re/NF-κB)	<i>I. ricinus</i>	GenBank [JAC92732]	IPT; RHD
	<i>I. scapularis</i>	GenBank [XP_002399379]	
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40197]	
<i>Imd pathway</i>			
PGRP	<i>A. cajennense</i>	GenBank [JAC22558]	PGRP; AMI_2
	<i>A. maculatum</i>	GenBank [AEO35424] GenBank [AEO33895] GenBank [AEO35281]	
	<i>I. ricinus</i>	GenBank [JAB71904] GenBank [JAB82531] GenBank [JAA69923] GenBank [JAA65379] GenBank [JAB73811] GenBank [JAA73323] GenBank [JAB81078] GenBank [JAA69922] GenBank [JAA66820]	
	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC16399] GenBank [EEC14113] GenBank [EEC04446] GenBank [EEC05089] GenBank [AAY66906]	
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40183] GenBank [CK178324]	

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Gene	Tick	Database [Number]	Structural domains
	<i>R. pulchellus</i>	GenBank [JAA60661] GenBank [JAA60662] GenBank [JAA60663] GenBank [JAA60577]	
UEV1a	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC08342]	UBCc
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40205]	
Effete	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC07155]	UBCc; COG5078
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40206]	
Bendless	<i>A. variegatum</i>	GenBank [DAA34583]	UBCc; COG5078
	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC07129]	
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40204]	
Caspar	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC01494]	UBL; Thioredoxin; UBO
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40198]	
IAP2	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC14778]	BIR; RING
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40207]	
POSH	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC20522]	RING; SH3_SH3RF1; SH3_SH3RF2; SH3_SH3RF3; SH3_SH3RFC
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40208]	
TAK1	<i>R. microplus</i>	GenBank [FG301710]	STKc; STKc_TAK1
TAB2	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC12297]	ZnF_RBZ; UBA_like_SF
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40199]	
IKK α	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC04355]	S_TKc; STKc_IKK
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40200]	
Kenny/NEMO (IKK γ)	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC05917]	S_TKc; STKc_NLK
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40201]	
Relish-like (Rel/NF- κ B)	<i>I. scapularis</i>	GenBank [XP_002434504]	IPT; RHD
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40202]	(ANK? DD?)
Hemipterous (MKK)	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC19865]	S_TKc; PKc_MKK4
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40209]	
Basket (JNK)	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC12544]	S_TKc; STKc_JNK
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40210]	
Puckered	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC00470]	DSPc
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40212]	
Jun-related antigen (Jra/AP-1)	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC01234]	bZIP_Jun; Jun
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40211]	
Fos-related antigen (Kayak/AP-1)	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC13979]	bZIP_Fos
	<i>R. microplus</i>	GenBank [CK187762]	
<i>JAK/STAT pathway</i>			
Domeless	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC12360]	PTPc; FN3; UP_III_II; TM
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40215]	
JAK tyrosine kinase	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC01610]	PTKc; Pkinase_Tyr; TyrKc
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40213]	
STAT	<i>I. ricinus</i>	GenBank [JAB75143]	SH2_STAT_family; STAT_bind super family; STAT_alpha; STAT_int
	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC07239]	
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40214]	
	<i>R. pulchellus</i>	GenBank [JAA59839] GenBank [JAA54737]	
STAM	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC03171]	VHS_STAM; SH3_STAM; PKc_like
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40218]	
SOCS	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC10036]	SOCS; SH2 super family
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40217]	
PIAS	<i>I. scapularis</i>	GenBank [EEC07489]	PINIT; zf-MIZ; Prothymosin
	<i>R. microplus</i>	GenBank [AIT40216]	

*A representative from multiples variants identified. AML_2: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity; ANK: ankyrin repeats; ARM: Armadillo/beta-catenin-like repeats; BIR: Baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat domain; bZIP_Fos: Basic leucine zipper (bZIP) domain of the oncogene Fos; bZIP_Jun: Basic leucine zipper (bZIP) domain of Jun proteins; C2: protein kinase C conserved region 2; Cactin_mid: Conserved mid region of cactin; Cactin_cactus: Cactus-binding C-terminus of cactin protein; CKnot: C-terminal cysteine-knot domain; COAG: Coagulin; COG5078: Ubiquitin-protein ligase; CUE: domain involved in binding ubiquitin-conjugating enzymes; DD: death domain; ECSIT: evolutionarily conserved signalling intermediate in Toll pathway; ECSIT_Cterm: C-terminal domain of the ECSIT protein; FN3: Fibronectin type 3 domain; IPT: immunoglobulin-like, plexins, transcription factor; Jun: Jun-like transcription factor; Kinase-1PKc_MKK4: Catalytic domain of the dual-specificity Protein Kinase, Mitogen-activated protein Kinase Kinase 4; LRR: leucine-rich repeat; LRR-CT: leucine-rich repeat C-terminal; LRR-NT: leucine-rich repeat N-terminal; MATH: Meprin-associated Traf homology domain; PEL: pellino Ser/Thr kinase-interacting domain; PGRP: Peptidoglycan recognition protein; PINIT: PIAS protein domain; PKc_like: Catalytic domain of the Protein Kinase superfamily; Pkinase_Tyr: Protein tyrosine kinase; Prothymosin: P rothymosin/parathymosin family; PTKc: Catalytic domain of Protein Tyrosine Kinases; PTPc: Protein tyrosine phosphatase, catalytic domain; RHD: Rel homology domain; RING: zinc-finger ring; SAM: STerile alpha motif; SH2 super family: Src homology 2 (SH2) domain; SH2_STAT_family: Src homology 2 (SH2) domain found in signal transducer and activator of transcription; SH3_SH3RFC: C-terminal (Fourth) Src Homology 3 domain of SH3 domain containing ring finger 1; SH3_SH3RF1: First Src Homology 3 domain of SH3 domain containing ring finger proteins; SH3_SH3RF2: Second Src Homology 3 domain of SH3 domain containing ring finger proteins; SH3_SH3RF3: Third Src Homology 3 domain of SH3 domain containing ring finger 1; SH3_STAM: Src homology 3 domain of Signal Transducing Adaptor Molecules; S_TKc: serine/threonine protein kinases, catalytic domain; STKc_IKK: Catalytic domain of the Serine/Threonine kinase, Inhibitor of Nuclear Factor- κ B Kinase; STKc_JNK: Catalytic domain of the Serine/Threonine Kinase, c-Jun N-terminal Kinase; STKc_NLK: Catalytic domain of the Serine/Threonine Kinase, Nemo-Like Kinase; STKc_TAK1: Catalytic domain of the Serine/Threonine Kinase, Transforming Growth Factor beta Activated; SOCS: suppressors of cytokine signalling; STAT_alpha: STAT protein, all-alpha domain; STAT_bind super family: STAT protein, DNA binding domain; STAT_int: STAT protein, protein interaction domain; Thioredoxin: Protein disulfide oxidoreductases and other proteins with a thioredoxin fold; TIR: Toll/interleukin-1 receptor; TM: transmembrane region; TyrKc: Tyrosine kinase, catalytic domain; UBA_like_SF: Ubiquitin-associated (UBA) domain-like superfamily; UBCc: Ubiquitin-conjugating enzyme E2; UP_III_II: Uroplakin IIIb, IIIa and II; UBL: Ubiquitin-like domain of UBL; UBO: Ubiquitin-like proteins; VHS_STAM: VHS domain family, STAM subfamily; zf-MIZ: MIZ/SP-RING zinc finger; ZnF_RBZ: Zinc finger domain in Ran-binding proteins.

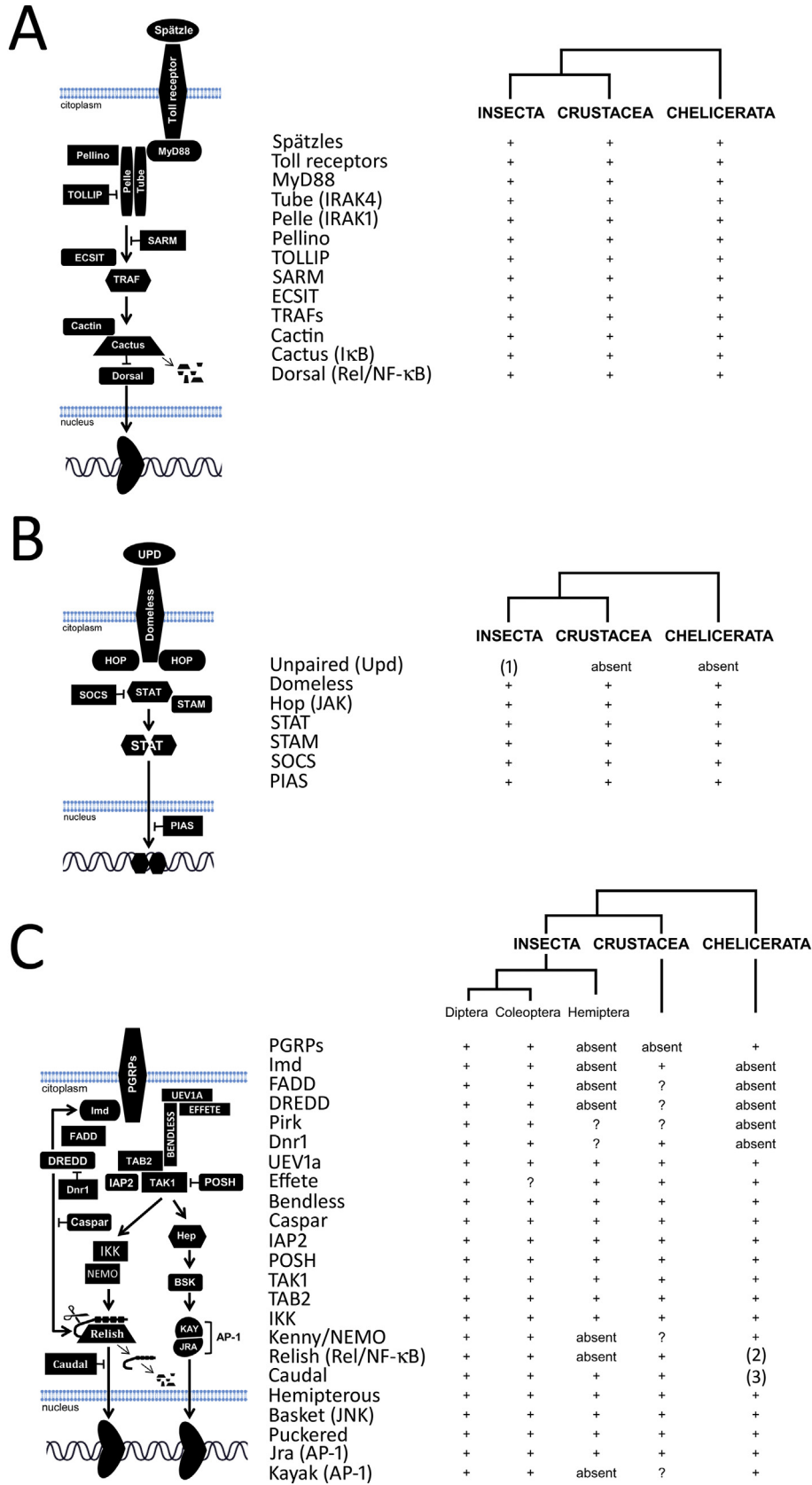


Fig. 1. Occurrence of signalling-related genes comprising the three main immune signalling pathways in arthropods: (A) Toll, (B) JAK/STAT and (C) IMD. (1) The Unpaired gene (Upd) is only found in *Drosophila* species. (2) Tick Relish-like proteins lack the typical ankirin repeats (IκB-like domain) and the C-terminal death domain (DD) found in class I NF-κB factors. (3) Tick homeobox proteins are more related to CDX-4 homeobox proteins from vertebrates than to Caudal proteins from other invertebrates.

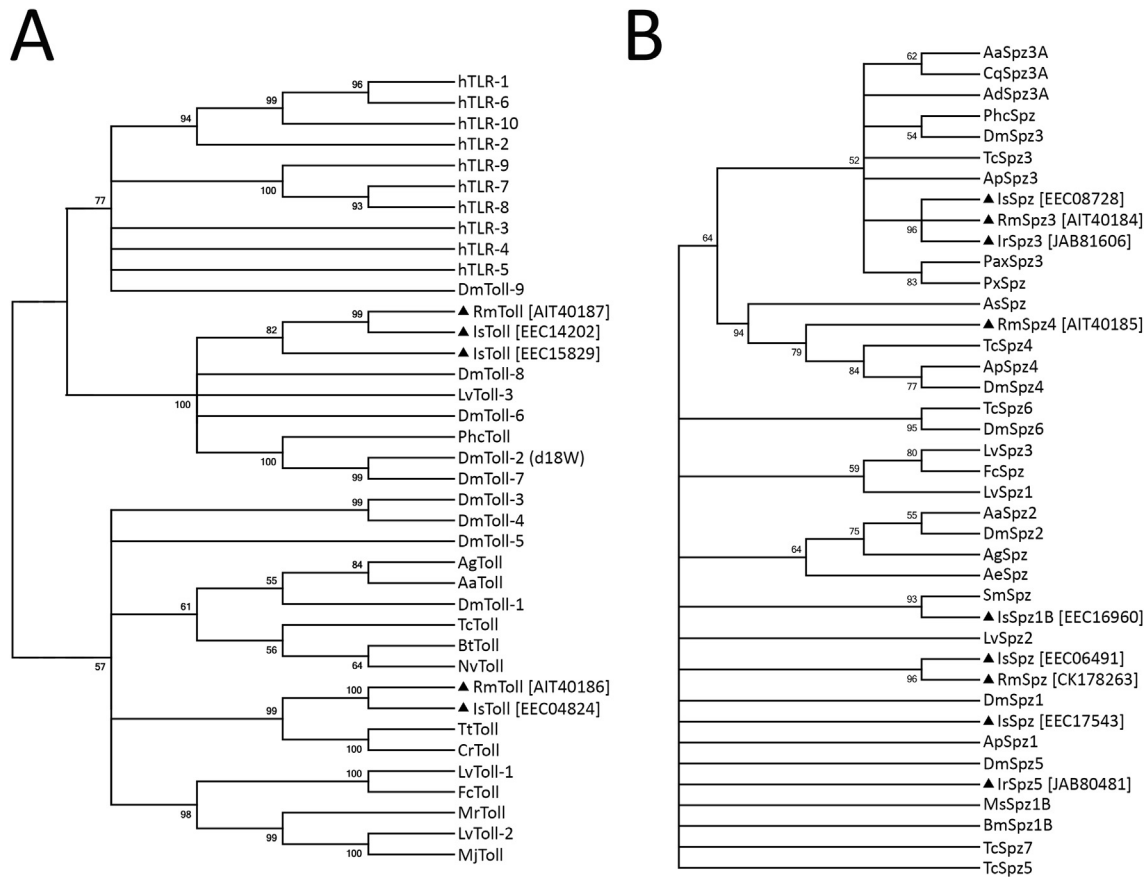


Fig. 2. Phylogenetic tree analysis of Toll receptors and Spätzle cytokines. The rooted trees were constructed using the Neighbor-Joining method in MEGA6. Bootstrap support values (1000 iterations) are shown inside the tree if higher than 50%. (A) Toll and Toll-like receptors (TLR). Sequences included in analyses were the following: (i) **chelicerates**: *Carcinoscorpius rotundicauda* CrToll (GenBank: ABK88278), *Ixodes scapularis* IsTolls (GenBank: EEC04824; EEC14202; EEC15829), *Rhipicephalus microplus* RmTolls (GenBank: AIT40186; AIT40187) and *Tachypleus tridentatus* TtToll (GenBank: BAD12073); (ii) **crustaceans**: *Fenneropenaeus chinensis* FcToll (GenBank: ABQ59330), *Litopenaeus vannamei* LvToll-1 to LvToll-3 (GenBank: ABK58729; AEK86516; AEK86517); *Macrobrachium rosenbergii* MrToll (GenBank: AHL39100), *Marsupenaeus japonicus* MjToll (GenBank: BAF99007); (iii) **insects**: *Aedes aegypti* AaToll (GenBank: XP_001658496), *Anopheles gambiae* AgToll (GenBank: XP_309197), *Bombus terrestris* BtToll (GenBank: XP_003394997), *Drosophila melanogaster* DmToll-1 to DmToll-9 (GenBank: P08953; AAF57509; AAF86229; AAF52747; AAF86227; AAF86226; AAF86225; AAF86224; AAF51581), *Nasonia vitripennis* NvToll (XP_001604577), *Pediculus humanus corporis* PhcToll (GenBank: EEB17714) and *Tribolium castaneum* TcToll (GenBank: EEZ99323); (iv) **vertebrates**: *Homo sapiens* hTLR-1 to hTLR10 (GenBank: AAC34137; AAC34133; AAC34134; AAY82270; ACM69030; EAW92902; AAZ99026; AAI01078; AAF72189; AAY78485). (B) Spätzle cytokines. Sequences included in analyses were the following: (i) **chelicerates**: *I. ricinus* IrSpz (GenBank: JAB80481; JAB81606), *I. scapularis* IsSpz (GenBank: EEC06491; EEC08728; EEC16960; EEC17543), *R. microplus* RmSpz (GenBank: AIT40184; AIT40185; CK178263) and *Stegodyphus mimosarum* SmSpz (GenBank: KFM66176); (ii) **crustaceans**: *Artemia sinica* AsSpz (GenBank: ADQ43816), *F. chinensis* FcSpz (GenBank: ACD36030) and *L. vannamei* LvSpz1 to LvSpz3 (GenBank: AEK86522; AEK86523; AEK86524); (iii) **insects**: *A. aegypti* AeSpz2 and AaSpz3A (GenBank: EAT47471; EAT39601), *Acromyrmex echinator* AeSpz (GenBank: EGI61959), *Acyrtosiphon pisum* ApSpz1, ApSpz3 and ApSpz4 (GenBank: NP_001153590; NP_001153591; NP_001153592), *Anopheles darlingi* AdSpz3A (GenBank: ETN63612), *A. gambiae* (GenBank: EAL40098), *Bombyx mori* BmSpz1 (GenBank: NP_001108066), *Culex quinquefasciatus* CqSpz3A (GenBank: EDS33566), *D. melanogaster* DmSpz-1 to DmSpz-6 (GenBank: AAF56658; NP_729009; NP_609160; NP_609504; AAF47694; AAF47261), *Manduca sexta* MsSpz1B (GenBank: ACU68554), *Papilio xuthus* PaxSpz3 (GenBank: BAM17861), *P. h. corporis* PhcSpz (GenBank: EEB14852), *Plutella xylostella* PxSpz (GenBank: ACZ05613) and *T. castaneum* TcSpz3 to TcSpz7 (GenBank: NP_001153625; EFA09263; EEZ97725; NP_001164082; EEZ99267). Black triangles correspond to tick sequences.

distinct clades, indicating that Spätzle is a diverse family of cytokines in this chelicerate group (Fig. 2B).

3.3. The JAK/STAT signalling pathway

Like the Toll pathway, the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) signalling cascade is evolutionary conserved in ticks (Fig. 1B). Among the seven components that usually comprise the JAK/STAT pathway in insects, the only one not found in any available transcriptomic or genomic tick library was the ligand of the Domeless receptor (Upd gene, Unpaired). In both the *R. microplus* transcriptome and *I. scapularis* genome, we have mapped all downstream components of the JAK/STAT pathway: the transmembrane cytokine receptor Domeless, the tyrosine kinase JAK (Hopscotch), the transcription factor STAT, the signal transducing adaptor molecule (STAM) and the inhibitor proteins PIAS (protein inhibitors of activated STAT) and SOCS

(suppressor of cytokine signalling) (Fig. 1B).

The structural domains of members of the tick JAK/STAT pathway, which confirm our claim of the existence of orthologues of these proteins, are presented in Table 1. STAT homologues were found in four tick species: *I. scapularis* (GenBank: EEC07239), *I. ricinus* (GenBank: JAB75143), *R. microplus* (GenBank: AIT40214) and *R. pulchellus* (GenBank: JAA54737; JAA59839). Phylogenetic analysis revealed that tick STATs form a single monophyletic cluster closely related to STATs from crustaceans (Fig. 3). STAT proteins from other invertebrates clustered into different groups.

3.4. The IMD and JNK signalling pathways

Regarding the IMD pathway, we have identified sequences coding for downstream members of both the NF- κ B/Relish and Jun N-terminal kinase (JNK) branches. However, key components of the IMD pathway were not found in our *in silico* analyses (Fig. 1C).

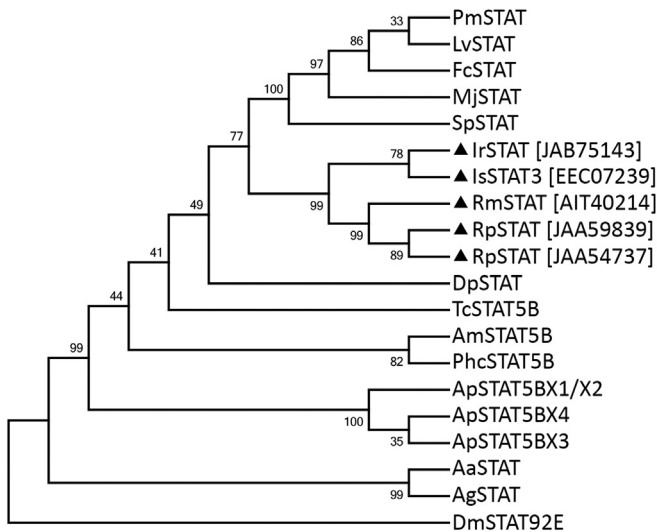


Fig. 3. Phylogenetic analysis of STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) proteins in arthropods. The rooted tree was constructed using the Neighbor-Joining method in MEGA6. Bootstrap support values (1000 iterations) are shown inside the tree if higher than 50%. Sequences included in analyses were the following: (i) chelicerales: *Ixodes ricinus* IrSTAT (GenBank: JAB75143), *Ixodes scapularis* IsSTAT (GenBank: EEC07239), *Rhipicephalus microplus* RmSTAT (GenBank: AIT40214) and *Rhipicephalus pulchellus* RpSTATs (GenBank: JAA54737; JAA59839); (ii) crustaceans: *Daphnia pulex* DpSTAT (GenBank: AFI39895), *Fenneropenaeus chinensis* FcSTAT (GenBank: ACH70130), *Litopenaeus vannamei* LvSTAT (GenBank: ADQ43368), *Marsupenaeus japonicus* MjSTAT (GenBank: BAI49681), *Penaeus monodon* PmSTAT (GenBank: AAQ94739) and *Scylla paramamosain* SpSTAT (GenBank: AHH29325); (iii) insects: *Acyrtosiphon pisum* ApSTAT5B-X1/X2 to ApSTAT5B-X4 (GenBank: XP_003247962; XP_001946645; XP_008188159), *Aedes aegypti* AaSTAT (GenBank: EAT38424), *Anopheles gambiae* AgSTAT (GenBank: ACO05014), *Apis mellifera* AmSTAT5B (GenBank: XP_397181), *Drosophila melanogaster* DmSTAT92E (GenBank: AAN14351), *Pediculus humanus corporis* PhcSTAT5B (GenBank: EEB14935) and *Tribolium castaneum* TcSTAT5B (GenBank: XP_008194026). Black triangles correspond to tick sequences.

Among the 18 members engaged in Relish activation in *Drosophila*, five are lacking in ticks (Fig. 1C). Those missing sequences were found neither in the transcriptome dataset of *R. microplus* nor even in the genome of *I. scapularis*. On the other hand, all five components of the JNK arm were identified.

Regarding the NF- κ B/Relish branch of the *Drosophila* IMD pathway, we identified multiple peptidoglycan recognition proteins (PGRPs), enzymes involved in ubiquitination (UEV1a, Effete/Ubc13 and Bendless/Ubc5), the inhibitor of apoptosis IAP2, the negative regulators Caspar (Fas-associating factor 1) and POSH (E3 ligase Plenty of SH3), transforming growth factor (TGF)- β -activated kinase 1 (TAK1), TAK1-binding protein 2 (TAB2), the I κ B kinases IKK- α and Kenny/NEMO (IKK γ), and a Relish-like Rel/NF- κ B transcription factor (Fig. 1C). The structural domains of the identified proteins are presented in Table 1. However, the adaptor protein IMD (immune deficiency), its associated molecule FAAD (Fas associated protein with death domain), the caspase DREDD (death related ced-3/Nedd2-like), and the negative regulators Pirk (poor IMD response upon knock-in) and Dnr1 (defence repressor 1) were not found in our searches. Confirmation of the lack of these sequences was obtained by mining the whole genome sequence of *I. scapularis* (GenBank: ABJB010000000).

In addition to the absence of some molecules, the other three IMD-associated proteins (PGRP, Caudal and Relish) from ticks showed no clear structural or phylogenetic relationships with their counterparts in other invertebrates. In *Drosophila*, the activation of the IMD adaptor protein is mediated by transmembrane PGRPs that recognize and bind to DAP-type peptidoglycans from bacteria. In our *in silico* analyses, we identified at least 24 PGRPs in different

tick species (Fig. 4A). However, all tick PGRPs contain only PGRP and AMI_2 (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity) domains, which are not the typical transmembrane domains found in PGRP members involved in activation of the *Drosophila* IMD pathway (Table 1). Additionally, like Spz-like sequences (Fig. 2B), tick PGRPs cluster into at least four distinct clades, indicating that PGRPs constitute a diverse family of pattern recognition proteins in invertebrates.

Another uncertain member of the tick IMD pathway is the negative regulator of Relish Rel/NF- κ B transcription factor and also the Caudal homeobox protein. In our searches, we did not identify a typical arthropod orthologue of the Caudal encoded gene in tick (homeobox transcription factor). A comparison of tick homeobox proteins with their counterparts in other groups showed that both *I. scapularis* and *R. microplus* homeobox proteins are more related to the human homeobox protein CDX-4 (GenBank: NP_005184) than to Caudal genes from other invertebrates (Fig. 4B). However, we found a homologue of insect Caudal in a related chelicerate group, the social spider *Stegodyphus mimosarum* (GenBank: KFM76228).

Finally, we identified a homologue of the *Drosophila* Rel/NF- κ B transcription factor Relish in both the *I. scapularis* genome (complete CDS; GenBank: XP_002434504) and the *R. microplus* transcriptome (incomplete CDS; GenBank: AIT40202). Unlike other class I NF- κ B factors, the full-length sequence of *I. scapularis* Relish lacks the typical ankirin repeats (I κ B-like domain) and the C-terminal death domain (DD). A conserved domain search showed that *I. scapularis* Relish contains only two domains characteristically found in class II NF- κ B factors such as invertebrate Dorsal proteins, RHD and IPT. Phylogenetic analysis based on the deduced amino acid sequences of Rel/NF- κ B transcription factors from arthropods and humans clustered them into two main groups. As expected, class II NF- κ B from ticks [the Dorsal proteins from *I. scapularis* (GenBank: XP_0023993790), *I. ricinus* (GenBank: JAC92732) and *R. microplus* (GenBank: AIT40197)] clustered in the same group with invertebrate Dorsal proteins, mosquito Rel1 and the human Rel/NF- κ B factors hRelA (p65), hRelB and hRel. Surprisingly, tick truncated Relish-like proteins were grouped with other class I NF- κ B factors, including mosquito Rel2, invertebrate Relish proteins and the human transcription factors NF- κ B1 (p105/p50) and NF- κ B2 (p100/p52) (Fig. 4C).

In contrast to the NF- κ B/Relish branch, all five components of the JNK branch of the tick IMD pathway were identified. This included the mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase Hemipterous (MKK), the Jun-kinase Basket (JNK), the AP-1 (Activator protein 1) transcription factors Jra (Jun-related antigen) and Fra (Fos-related antigen/Kayak) and the negative regulator Puckered (Table 1; Fig. 1C).

3.5. Differential susceptibility of BME26 cells to rickettsial infections

We analysed the susceptibility of BME26 cells to *A. marginale*, a *R. microplus*-borne rickettsia, compared to *R. rickettsii*, which is not transmitted by this tick species. To that end, BME26 cells were incubated with *A. marginale* inoculum (941 rickettsiae/cell) or *R. rickettsii* inoculum (3.3×10^{-2} rickettsiae/cell). The progression of infection and the viability of the BME26-infected cells were monitored at 6, 24, 48 and 72 h post-infection by absolute qPCR quantification and light microscopy (trypan blue staining), respectively. Whereas the total number of *A. marginale* was relatively constant ($\sim 5.4 \times 10^7$ rickettsiae/flask), we observed an increase in the number of *R. rickettsii* during the infective process of BME cells (Fig. 5). We detected *R. rickettsii* in BME26 cells only after 48 h post-infection (1.9×10^6 rickettsiae/flask). Prior to this time (at 6 and 24 h), the *R. rickettsii* counts in BME26 cells were below the detection threshold of qPCR absolute quantification (Fig. 5).

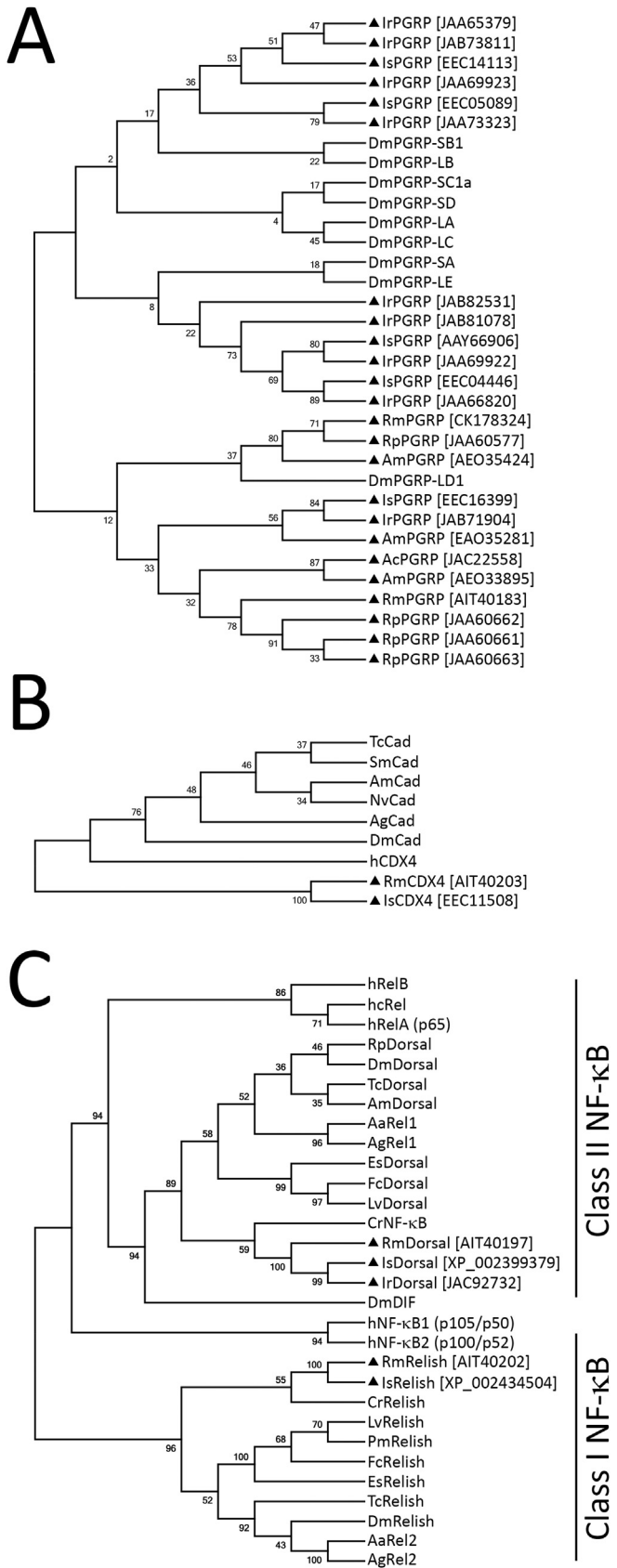


Fig. 4. Phylogenetic tree analysis of PGRPs (Peptidoglycan Recognition Proteins), Caudal/CDX-4 homeobox proteins and Rel/NF-κB transcription factors. The rooted trees were constructed using the Neighbor-Joining method in MEGA6. Bootstrap support values (1000 iterations) are shown inside the tree if higher than 50%. (A) PGRPs.

Although no differences were found in *R. rickettsii* quantification between 48 and 72 h, BME26 mortality reached approximately 45% at 72 h post-infection (Fig. 5). After this time point, most of the cells had detached from the flasks. Comparatively, the mortality rate in *A. marginale*-infected cells was less than 10%.

3.6. Members of tick immune signalling pathways are differentially expressed in BME26 cells upon microbial challenge

To gain a better understanding of the transcriptional response of the genes encoding tick immune signalling pathway components, we analysed their temporal transcriptional profile in response to different microbial challenges. Transcriptional analysis of 36 selected sequences was conducted in BME26 cells at 6, 24 and 72 h post-stimulation with heat-killed microorganisms (*M. luteus* or *E. cloacae* or *S. cerevisiae*) or after experimental infection with one of two rickettsiae: *A. marginale* or *R. rickettsii*. The gene expression profile of BME26-infected cells was compared to that of control cells using a high-throughput microfluidic RT-qPCR approach (Spurgeon et al., 2008).

The high-throughput RT-qPCR analysis generated a large amount of expression data (3000 Cq values) that were globally analysed in a heat map graph (Fig. 6). The results revealed that tick immune signalling pathway-associated genes are constitutively transcribed in BME26 cells but are differentially expressed in response to microbial challenges. In general, stimulation of BME26 cells with heat-killed microorganisms induced the expression of genes encoding components of all three tick immune signalling pathways. Challenge with the gram-negative bacterium *E. cloacae* induced the expression of most of the analysed genes after 6 h, and most of these genes continued to be induced until 72 h. Comparatively, the induction of these genes in BME26 cells stimulated with the gram-positive *M. luteus* was observed mainly at

Sequences included in analyses were the following: (i) **chelicerates**: *Amblyomma cajennense* AcPGRP (GenBank: JAC22558), *Amblyomma maculatum* AmPGRPs (GenBank: AEO33895; AEO35281; AEO35424), *Ixodes ricinus* IrPGRPs (GenBank: JAA65379; JAA66820; JAA69922; JAB71904; JAA73323; JAB73811; JAB81078; JAB82531), *Ixodes scapularis* IsPGRPs (GenBank: AAY66906; EEC04446; EEC05089; EEC14113; EEC16399), *Rhipicephalus microplus* RmPGRPs (GenBank: AIT40183; CK178324) and *Rhipicephalus pulchellus* RpPGRPs (GenBank: JAA60577; JAA60661; JAA60662; JAA60663); (ii) **insects**: *Drosophila melanogaster* short PGRPs (GenBank: AAG23734; AAF49420; NP_610407; AAF50530) and long PGRPs (GenBank: Q95T64; Q8INK6; AAG23733; AAG32062; AAG32064). (B) Caudal/CDX-4 homeobox proteins. Sequences included in analyses were the following: (i) **chelicerates**: *Ixodes scapularis* IsCDX4 (GenBank: EEC11508), *Rhipicephalus microplus* RmCDX4 (GenBank: AIT40203) and *Stegodyphus mimosarum* SmCad (GenBank: KFM76228); (ii) **insects**: *Anopheles gambiae* AgCad (GenBank: XP_318681), *Apis mellifera* AmCad (GenBank: NP_001239359), *Drosophila melanogaster* DmCad (GenBank: AAA28409), *Nasonia vitripennis* NvCad (GenBank: ABI49991) and *Tribolium castaneum* TcCad (GenBank: NP_001034498); (iii) **vertebrates**: *Homo sapiens* hCDX4 (GenBank: NP_005184). (C) Rel/NF-κB transcription factors. Sequences included in analyses were the following: (i) **chelicerates**: *Carcinoscorpius rotundicauda* CrNF-κB (GenBank: AAZ40333) and CrRelish (GenBank: ABC75034), *Ixodes ricinus* IrDorsal (GenBank: JAC92732), *Ixodes scapularis* IsDorsal (GenBank: XP_002399379) and IsRelish (GenBank: XP_002434504) and *Rhipicephalus microplus* RmDorsal (GenBank: AIT40197) and RmRelish (GenBank: AIT40202); (ii) **crustaceans**: *Eriocheir sinensis* EsDorsal (GenBank: AHG95994) and EsRelish (GenBank: ADM14334), *Fenneropenaeus chinensis* FcDorsal (GenBank: ACJ36225) and FcRelish (GenBank: ACJ36224), *Litopenaeus vannamei* LvDorsal (GenBank: ACZ98167) and LvRelish (GenBank: ABR14713) and *Penaeus monodon* PmRelish (GenBank: AFH66691); (iii) **insects**: *Acyrtosiphon pisum* ApDorsal (GenBank: XP_001949498), *Aedes aegypti* AeRel1 (GenBank: AAW67215) and AeRel2 (GenBank: AAM97895), *Anopheles gambiae* AgRel1 (GenBank: CAA65156) and AgRel2 (GenBank: AAQ57599), *Drosophila melanogaster* DmDIF (GenBank: AAA28465), DmDorsal (GenBank: AAT94434) and DmRelish (GenBank: NP_477094), *Rhodnius prolixus* RpDorsal (GenBank: ABU96698) and *Tribolium castaneum* TcDorsal (GenBank: NP_001034507) and TcRelish (GenBank: EEZ97717); (iv) **vertebrates**: *Homo sapiens* hRelA p65 (GenBank: AAI10831), hRelB (GenBank: Q01201), hc-Rel (GenBank: CAA52954), hNF-κB1 p105/p50 (GenBank: CAB94757) and hNF-κB2 p100/p52 (GenBank: AAB21124). Black triangles correspond to tick sequences.

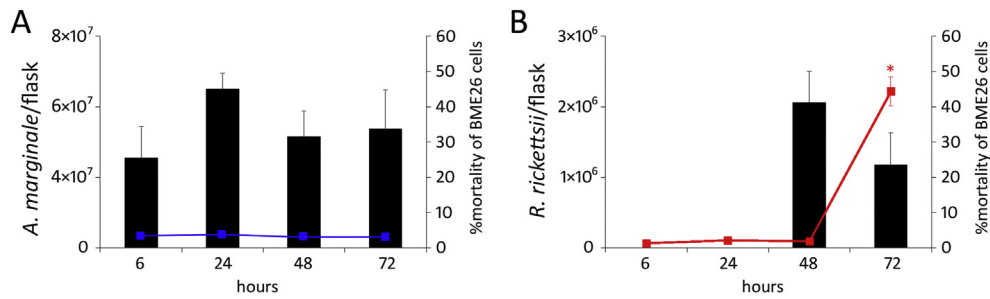


Fig. 5. Rickettsial growth in BME26 cells. The progression of infection (bar graphs) was monitored by absolute qPCR in BME26 cells infected with (A) *Anaplasma marginale* or (B) *Rickettsia rickettsii*. The mortality of BME26 cells (line graphs) was determined by trypan blue staining under light microscopy. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

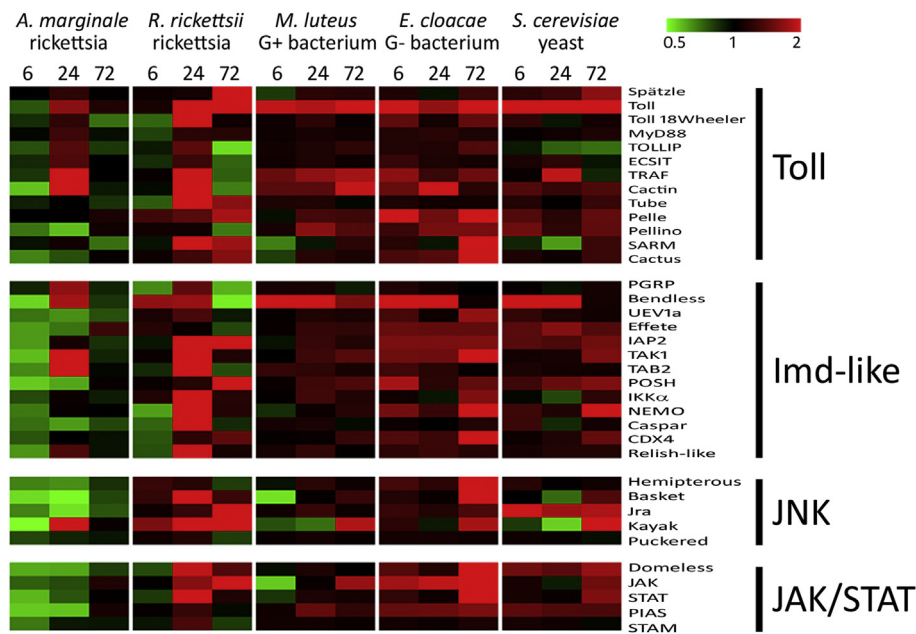


Fig. 6. Global gene expression profile of BME26 cells in response to different microbial challenges and rickettsial infections. Relative expressions were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method in cells challenged with the Gram-negative bacterium *Enterobacter cloacae* β -12, the Gram-positive bacterium *Micrococcus luteus* ATCC 9341A and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* W303 and after experimental infections with the rickettsiae *Anaplasma marginale* (Jaboticabal strain) and *Rickettsia rickettsii* (Taiacú strain). Each cell in the matrix corresponds to the expression level of one gene in a sample (mean values of biological triplicates). The intensity of the color from green to red indicates the magnitude of differential expression, based on the color scale at the top of the figure.

24 h post-stimulation. Conversely, genes from all the signalling pathways showed a distinct temporal gene expression profile in cultured cells stimulated with the yeast *S. cerevisiae*, with several genes induced at 6 h and repressed at 24 h. Remarkably, several genes, including some repressed at 24 h, were induced at 72 h after stimulation (Fig. 6).

Additionally, we evaluated the expression profile of these selected genes in BME26 cells experimentally infected with the rickettsiae *A. marginale* or *R. rickettsii*. Global transcriptional analysis revealed striking differences in gene expression in BME26 harbouring *A. marginale* compared to *R. rickettsii*-infected cells. Regarding *A. marginale* infection, most of the analysed genes were down-regulated, except the expression of eight genes from the Toll pathway and five genes comprising the NF- κ B/Relish branch of IMD pathway, which were induced in BME26 cells at 24 h post-infection (Fig. 6). Genes from the JAK/STAT pathway and those from the JNK branch of the IMD pathway were down-regulated at nearly all examined times post-infection. In *R. rickettsii*-infected cells, the expression of most of the genes was induced at 24 h post-infection (Fig. 6). At 72 h post-infection, while the transcript level of some

members remained elevated, other genes were down-regulated.

4. Discussion

Ticks are important vectors of disease-causing pathogens in humans and both wild and domesticated animals. However, in contrast to their insect counterparts, little is known about the tick immune system and its interaction with infectious agents. Far less attention has been paid to the activation of tick immune responses by intracellular signalling cascades. Much of the information about microbial-triggered intracellular signalling pathways in chelicerates has resulted from molecular and functional studies on signalling molecules identified in horseshoe crabs (Belinda et al., 2008; Fan et al., 2008; Wang et al., 2006). However, even with the identification of some immune signalling genes in the black-legged tick *I. scapularis* (Liu et al., 2012; Smith and Pal, 2014), knowledge on the full scope of tick immune signalling pathways is still fragmented. Taking advantage of the genomic and transcriptomic data available for different tick species, we have confirmed that both the Toll and JAK/STAT pathways are

evolutionarily conserved across arthropods.

The Toll signalling cascade is essential for embryonic development and immunity in different invertebrate groups, but it also plays a major role in sensing and initiating innate immune responses in vertebrates (Trinchieri and Sher, 2007). As in other insects and crustaceans, tick Toll receptors seem to be cytokine receptors rather than pattern recognition proteins like the human TLR (Toll-like receptor) family. Indeed, we did not find M/PAMP-binding insertions in the extracellular LRR domains of tick Tolls, and additionally, we identified multiple orthologues of Spätzle cytokines (the insect Toll ligand) in different tick species. In *Drosophila*, the activation of Toll by its interaction with the Spätzle cytokine triggers an intracellular cascade that activates cytosolic signalling-related proteins to induce the expression of antimicrobial peptides (AMPs) (Valanne et al., 2011). The presence of multiple Toll receptors and Spätzle cytokines, as well as all downstream members of this pathway (MyD88, Tube, Pelle, TRAF, Cactus, Dorsal and their regulators and interacting proteins), suggests that the Toll pathway is also involved in the regulation of tick immune responses against invading microorganisms and pathogens transmitted to vertebrate hosts.

The sequence diversity found in tick Tolls and Spätzle cytokines has also been documented for insect (Bao et al., 2013; Gerardo et al., 2010; Hetru and Hoffmann, 2009) and crustacean species (McTaggart et al., 2009; Wang et al., 2012). Interestingly, tick Spätzle diversity includes sequences containing a coagulin domain, which is also found in coagulogen, the clottable protein of horseshoe crabs (Kawabata, 2010). Activation of the horseshoe crab coagulation system initiates with the recognition of bacterial LPS or fungal β -1,3-D-glucans, activating a proteolytic cascade that ends with the cleavage of the proclotting enzyme into active clotting enzyme, which converts the coagulogen protein to coagulin, forming an insoluble clot (Cerenius et al., 2010). Interestingly, components of the horseshoe crab coagulation system show structural similarities with components of the proteolytic cascade leading to the processing of insect Spätzle, suggesting a common ancestral origin (Bergner et al., 1997). However, no orthologues of Spätzle cytokines have been identified in horseshoe crabs. Therefore, it has been proposed that the horseshoe crab coagulation cascade may participate in activation of the Toll pathway via interaction of the processed coagulogen protein with the Toll receptor (Inamori et al., 2004). Conversely, ticks apparently lack the haemolymph coagulation system found in horseshoe crabs, since coagulation in tick hemolymph has not been experimentally proven (Hajdusek et al., 2013; Kopacek et al., 2010), and thus the presence of a coagulin domain in Spätzle cytokines brings new evidence to the origin of the Spätzle-activating proteolytic cascade in invertebrates.

Like the Toll pathway, all downstream components of the JAK/STAT cytokine signalling pathway are also conserved in ticks. However, we did not find any putative ligand of the tick JAK/STAT receptor Domeless. Indeed, homologues of the Unpaired genes *upd*, *upd2* and *upd3* (the *Drosophila* Domeless ligand) have only been identified in fruit fly species (Myllymaki and Ramet, 2014), suggesting that Domeless can act as a promiscuous cytokine receptor in other arthropods. In dipteran insects, the JAK/STAT pathway is involved in several immune and physiological processes, such as embryonic patterning, haematopoiesis and both cellular and gut immunity, including antiviral and antiparasitic responses (Bahia et al., 2011; Myllymaki and Ramet, 2014; Souza-Neto et al., 2009). In *I. scapularis* ticks, this cytokine signalling pathway plays an important role in *A. phagocytophilum* infection (Liu et al., 2012). *A. phagocytophilum* is an obligate intracellular tick-borne bacterium that causes human granulocytic anaplasmosis. Liu et al. (2012) showed that the gene encoding a tick AMP of 5.3 kDa (Pichu

et al., 2009) is highly induced in salivary glands upon *A. phagocytophilum* infection and that its expression is controlled by the JAK/STAT pathway (Liu et al., 2012). Interestingly, post-transcriptional silencing via RNA interference (RNAi) of either the 5.3-kDa AMP or STAT gene increases bacterial infection and transmission, suggesting that the JAK/STAT pathway is likely involved in regulation of the expression of the 5.3-kDa AMP, controlling *A. phagocytophilum* infection (Liu et al., 2012). In contrast, reduction of STAT gene expression results in decreased Lyme disease spirochete *B. burgdorferi* colonization in the *I. scapularis* gut (Narasimhan et al., 2014). As STAT knockdown led to peritrophic matrix thinning in the tick gut, authors have suggested that PM might act as a shield by *Borrelia* to protect itself from the blood contained in tick gut.

The current study is not the first one reporting the lack of a conserved IMD pathway in an invertebrate. Central components of the IMD pathway were also not found in the genomes of two insects: the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (PGRP, IMD, FADD, DREDD and Relish) (Gerardo et al., 2010), the body louse *P. humanus corporis* (IMD and FADD) (Kim et al., 2011), and the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (IMD, FADD, DREDD and Caspar) (Mesquita et al., 2015). Moreover, this signalling cascade appears to be absent in bivalve molluscs such as mussels and oysters (Toubiana et al., 2014). In our searches, we have not found tick orthologues of IMD or its associated proteins FADD, DREDD, Pirk or Dnr1, nor any authentic transmembrane long PGRP forms (PGRP-L), Caudal homeobox proteins or an ankirin-containing Relish Rel/NF- κ B transcription factor. Surprisingly, a homologue of DREDD (Death related ced-3/Nedd2-like) was reported in *I. scapularis* (VectorBase: ISCW003039) (Smith and Pal, 2014), but in our *in silico* analysis, this sequence was annotated as an effector caspase (GenBank: EEC04654). In conclusion, although there is a strong evidence of the lack of a well-conserved IMD pathway in invertebrates, more studies have to be carried out in order to define how the upstream activation of the IMD occurs. Other discrepancy was found in the annotation of the published *I. scapularis* Dorsal-related immunity factor or DIF (VectorBase: ISCW000140) (Smith and Pal, 2014), which is in fact a Dorsal homologue (GenBank: XP_002399379). Therefore, the DIF Rel/NF- κ B factor seems to be exclusive to *Drosophila* fruit flies (Cirimotich et al., 2010; Valanne et al., 2011).

Drosophila IMD is a dead domain (DD)-containing protein that activates the TAK1 complex following the activation of long PGRP members (PGRP-L) by DAP-type peptidoglycan from gram-negative bacteria. Conversely, short PGRPs (PGRP-S) are involved in activation of the Toll pathway by the recognition and binding of Lys-type peptidoglycan from gram-positive bacteria (Lemaitre, 2004). The PRGP homologues identified in tick genomic and transcriptomic datasets lack the typical transmembrane domain found in *Drosophila* PGRPs involved in activation of the IMD pathway. Thus, the roles of these pattern recognition receptors in the activation of tick immune signalling pathways need to be better understood. In addition, we have no evidence on the existence of an authentic Relish Rel/NF- κ B factor in ticks. Indeed, neither ankirin repeats (I κ B-like domain) nor a conserved DD was found in tick Relish-like homologs. Although truncated Relish-like proteins of ticks cluster with other class I NF- κ B factors in our phylogenetic analysis, tick Rel/NF- κ B proteins seem to correspond to class II NF- κ B factors due to the presence of both RDH and IPT domains in their architecture. Thus, we can hypothesize that class II NF- κ B factors comprise a diverse family of transcription factors in ticks, as observed in humans (RelA/p65, RelB and c-Rel) (O'Dea and Hoffmann, 2010; Sun, 2008). Therefore, studies on the biological function of tick Rel/NF- κ B factors and their involvement in tick immune responses are warranted, as previously described for CrNF- κ B and CrRelish from the mangrove horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda*

(Fan et al., 2008; Wang et al., 2006).

The lack of crucial components of the IMD pathway in ticks suggests the presence of alternative signal transduction pathways for the regulation of immune-related genes in arachnids. The first question regards activation of the TAK1/TAB2 complex, usually triggered by active IMD adaptor protein (Hetru and Hoffmann, 2009). In the absence of the IMD adaptor and its associated proteins, one can speculate that TAK1/TAB2 can be activated by an IMD-independent receptor (mediated or not by PRGPs) or by an alternative (noncanonical) downstream cascade of the Toll pathway as occurs in vertebrates (Sun, 2008). The possible lack of a true class I Rel/NF- κ B factor in ticks suggests that the TAK1/TAB2 complex may be exclusively involved in JNK activation. The uniqueness of the tick immune system is due not only to the possible lack of the IMD pathway. Unlike other arthropods, some key immune responses such as the prophenoloxidase and clotting cascades are absent in ticks (Hajdusek et al., 2013; Kopacek et al., 2010).

Using high-throughput qPCR analysis, we showed that tick immune signalling-associated genes are constitutively transcribed in BME26 cells (derived from the cattle tick *R. microplus*) and exhibit different transcriptional patterns in response to microbial challenge. In a previous study, our research group showed that BME26 cells constitutively express some immune-related genes (Esteves et al., 2008). However, to our knowledge, this is the first study presenting the immune-specific expression profile in a tick cell-line. Transcriptional data of immune-signalling genes can be used to better understand how *R. microplus* ticks respond to different microbial stimuli and rickettsial infections. Indeed, it was previously reported that the expression of immune signalling genes upon microbial challenge is similar between embryonic Aag-2 cells and *A. aegypti* mosquitoes (Barletta et al., 2012).

In addition to presenting different transcriptional patterns upon microbial challenge, BME26 cells also showed differential susceptibility to rickettsial infection. Indeed, the *R. microplus*-transmitted *A. marginale* did not have a deleterious effect on BME26 cells. In contrast, BME26 cells were highly susceptible to *R. rickettsii*, which is not transmitted by the cattle tick. Together with the distinct transcriptional response of BME26 cells to these rickettsiae, these results highlight the potential use of BME26 cells to investigate the molecular mechanisms involved in the transmission of *A. marginale* to vertebrate hosts. In addition, BME26 cells can be used as a model for functional studies in order to identify and characterize the immune-related genes that are controlled by tick immune signalling pathways. To date, only two studies in the blacklegged tick *I. scapularis* have investigated the genes regulated by the JAK/STAT signalling pathway (Liu et al., 2012; Narasimhan et al., 2014). Collectively, our work confirmed that BME26 cells are a useful tool for research on immunity and host-pathogen interactions in ticks.

In conclusion, by mining the publicly available tick genomic and transcriptomic data, we identified orthologues of insect immune signalling pathways (Toll, IMD and JAK/STAT) whose members are differentially expressed in a tick cell line after microbial challenge. We provided evidence for the presence of both the Toll and JAK/STAT pathways in ticks, and we showed that the IMD pathway is not evolutionarily conserved in this chelicerate group. Indeed, although the JNK arm of the IMD pathway was shown to be present, key components of the NF- κ B/Relish arm are missing in ticks. Moreover, *A. marginale* caused downregulation of immune-related genes, suggesting that this pathogen may manipulate the tick immune system, favouring its survival and vector colonization. These findings open new directions in understanding the cell molecular processes involved in the regulation of tick immunity. Elucidating the mechanisms underlying the activation of tick immune responses is crucial for the development of effective strategies for the

control and prevention of different tick-borne diseases worldwide.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Milton Moraes for microfluidic RT-qPCR analysis and Mario Balanco for technical assistance. R.D. Rosa and P.C. Pohl were supported by post-doctoral fellowships from CAPES and CNPq, respectively. J.C. Peixoto and S. Kalil received doctoral scholarships provided by FAPESP (grants 2011/23549-2 and 2013/25213-7) and CNPq, respectively. This research was partially supported by grants from FAPESP (2010/50940-1, 2011/22124-8, 2013/24673-4, 2013/26450-2), CNPq, CAPES and INCT-EM.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.018>.

References

- Aubry, P., Geale, D.W., 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 1–30.
- Bahia, A.C., Kubota, M.S., Tempone, A.J., Araujo, H.R., Guedes, B.A., Orfano, A.S., Tadei, W.P., Rios-Velasquez, C.M., Han, Y.S., Secundino, N.F., Barillas-Mury, C., Pimenta, P.F., Traub-Cseko, Y.M., 2011. The JAK-STAT pathway controls Plasmodium vivax load in early stages of Anopheles aquasalis infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1317.
- Bao, Y.Y., Qu, L.Y., Zhao, D., Chen, L.B., Jin, H.Y., Xu, L.M., Cheng, J.A., Zhang, C.X., 2013. The genome- and transcriptome-wide analysis of innate immunity in the brown planthopper, Nilaparvata lugens. *BMC Genom.* 14, 160.
- Barletta, A.B., Silva, M.C., Sorgine, M.H., 2012. Validation of Aedes aegypti Aag-2 cells as a model for insect immune studies. *Parasites Vectors* 5, 148.
- Belinda, L.W., Wei, W.X., Hanh, B.T., Lei, L.X., Bow, H., Ling, D.J., 2008. SARM: a novel Toll-like receptor adaptor, is functionally conserved from arthropod to human. *Mol. Immunol.* 45, 1732–1742.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36–D42.
- Bergner, A., Muta, T., Iwanaga, S., Beisel, H.G., Delotto, R., Bode, W., 1997. Horseshoe crab coagulogen is an invertebrate protein with a nerve growth factor-like domain. *Biol. Chem.* 378, 283–287.
- Bifano, T.D., Ueti, M.W., Esteves, E., Reif, K.E., Braz, G.R., Scoles, G.A., Bastos, R.G., White, S.N., Daffre, S., 2014. Knockdown of the Rhipicephalus microplus cytochrome c oxidase subunit III gene is associated with a failure of Anaplasma marginale transmission. *PLoS one* 9, e98614.
- Cerenius, L., Kawabata, S., Lee, B.L., Nonaka, M., Soderhall, K., 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem. Sci.* 35, 575–583.
- Cirimotich, C.M., Dong, Y., Garver, L.S., Sim, S., Dimopoulos, G., 2010. Mosquito immune defenses against plasmodium infection. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 387–395.
- Dantas-Torres, F., Chomel, B.B., Otranto, D., 2012. Ticks and tick-borne diseases: a one health perspective. *Trends Parasitol.* 28, 437–446.
- de Andrade, G.M., Machado, R.Z., Vidotto, M.C., Vidotto, O., 2004. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of Anaplasma marginale. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 257–266.
- de la Fuente, J., Moreno-Cid, J.A., Canales, M., Villar, M., de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Galindo, R.C., Almazan, C., Blouin, E.F., 2011. Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Vet. Parasitol.* 181, 17–22.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Esteves, E., Bastos, C.V., Zivkovic, Z., de la Fuente, J., Kocan, K., Blouin, E., Ribeiro, M.F., Passos, L.M., Daffre, S., 2009. Propagation of a Brazilian isolate of Anaplasma marginale with appendage in a tick cell line (BME26) derived from Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Vet. Parasitol.* 161, 150–153.
- Esteves, E., Lara, F.A., Lorenzini, D.M., Costa, G.H., Fukuzawa, A.H., Pressinotti, L.N., Silva, J.R., Ferro, J.A., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., Daffre, S., 2008. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 568–580.
- Fan, Z.H., Wang, X.W., Lu, J., Ho, B., Ding, J.L., 2008. Elucidating the function of an ancient NF-kappaB p100 homologue, CrRelish, in antibacterial defense. *Infect. Immun.* 76, 664–670.
- Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heeger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E.L., Tate, J., Punta, M., 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* 42, D222–D230.
- Gaff, H.D., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E., 2014. Tick-borne Rickettsioses II (Anaplasmataceae). In: Sonenshine, D.E., Roe, M.R. (Eds.), *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York, pp. 251–277.
- Galletti, M.F., Fujita, A., Nishiyama Jr., M.Y., Malossi, C.D., Pinter, A., Soares, J.F.,

- Daffre, S., Labruna, M.B., Fogaca, A.C., 2013. Natural blood feeding and temperature shift modulate the global transcriptional profile of *Rickettsia rickettsii* infecting its tick vector. *PLoS one* 8, e77388.
- Gerardo, N.M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, S.M., de Vos, M., Duncan, E.J., Evans, J.D., Gabaldon, T., Ghanim, M., Heddi, A., Kaloshian, I., Latorre, A., Moya, A., Nakabachi, A., Parker, B.J., Perez-Brocad, V., Pignatelli, M., Rahbe, Y., Ramsey, J.S., Spragg, C.J., Tamames, J., Tamarit, D., Tamborindeguy, C., Vincent-Monegat, C., Vilcinskas, A., 2010. Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrthosiphon pisum*. *Genome Biol.* 11, R21.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R., Barros, A.T., Andreotti, R., Cancado, P.H., Leon, A.A., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 150–156.
- Gupta, L., Molina-Cruz, A., Kumar, S., Rodrigues, J., Dixit, R., Zamora, R.E., Barillas-Mury, C., 2009. The STAT pathway mediates late-phase immunity against plasmodium in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Cell Host Microbe* 5, 498–507.
- Hajdusek, O., Sima, R., Ayllon, N., Jalovecka, M., Perner, J., de la Fuente, J., Kopacek, P., 2013. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 26.
- Hetru, C., Hoffmann, J.A., 2009. NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a000232.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, A.C., Ezekowitz, R.A., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313–1318.
- Inamori, K., Ariki, S., Kawabata, S., 2004. A Toll-like receptor in horseshoe crabs. *Immunol. Rev.* 198, 106–115.
- Kawabata, S., 2010. Immunocompetent molecules and their response network in horseshoe crabs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 708, 122–136.
- Kellogg, R.A., Gomez-Sjoberg, R., Leyrat, A.A., Tay, S., 2014. High-throughput microfluidic single-cell analysis pipeline for studies of signaling dynamics. *Nat. Protoc.* 9, 1713–1726.
- Kim, J.H., Min, J.S., Kang, J.S., Kwon, D.H., Yoon, K.S., Strycharz, J., Koh, Y.H., Pittendrigh, B.R., Clark, J.M., Lee, S.H., 2011. Comparison of the humoral and cellular immune responses between body and head lice following bacterial challenge. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 332–339.
- Kleino, A., Silverman, N., 2014. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Dev. Comp. Immunol.* 42, 25–35.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A., 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 167, 95–107.
- Kockel, L., Homsy, J.G., Bohmann, D., 2001. *Drosophila* AP-1: lessons from an invertebrate. *Oncogene* 20, 2347–2364.
- Kopacek, P., Hajdusek, O., Buresova, V., Daffre, S., 2010. Tick innate immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 708, 137–162.
- Lemaitre, B., 2004. The road to Toll. *Nature reviews. Immunology* 4, 521–527.
- Liu, L., Dai, J., Zhao, Y.O., Narasimhan, S., Yang, Y., Zhang, L., Fikrig, E., 2012. Ixodes scapularis JAK-STAT pathway regulates tick antimicrobial peptides, thereby controlling the agent of human granulocytic anaplasmosis. *J. Infect. Dis.* 206, 1233–1241.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- McTaggart, S.J., Conlon, C., Colbourne, J.K., Blaxter, M.L., Little, T.J., 2009. The components of the *Daphnia pulex* immune system as revealed by complete genome sequencing. *BMC Genom.* 10, 175.
- Mesquita, R.D., Vionette-Amaral, R.J., Lowenberger, C., Rivera-Pomar, R., Monteiro, F.A., Minx, P., Spieth, J., Carvalho, A.B., Panzera, F., Lawson, D., Torres, A.Q., Ribeiro, J.M., Sorgine, M.H., Waterhouse, R.M., Montague, M.J., Abad-Franck, F., Alves-Bezerra, M., Amaral, L.R., Araujo, H.M., Araujo, R.N., Aravind, L., Atella, G.C., Azambuja, P., Berni, M., Bittencourt-Cunha, P.R., Braz, G.R., Calderon-Fernandez, G., Carareto, C.M., Christensen, M.B., Costa, I.R., Costa, S.G., Dansa, M., Daumas-Filho, C.R., De-Paula, I.F., Dias, F.A., Dimopoulos, G., Emrich, S.J., Esponda-Behrens, N., Fampa, P., Fernandez-Medina, R.D., da Fonseca, R.N., Fontenele, M., Fronick, C., Fulton, L.A., Gandara, A.C., Garcia, E.S., Genta, F.A., Giraldo-Calderon, G.L., Gomes, B., Gondim, K.C., Granzotto, A., Guarneri, A.A., Guigo, R., Harry, M., Hughes, D.S., Jablonka, W., Jacquín-Joly, E., Juárez, M.P., Koerich, L.B., Latorre-Estivalis, J.M., Lavore, A., Lawrence, G.G., Lazoski, C., Lazzari, C.R., Lopes, R.R., Lorenzo, M.G., Lugon, M.D., Majerowicz, D., Marcet, P.L., Mariotti, M., Masuda, H., Megy, K., Melo, A.C., Missirliis, F., Mota, T., Noriega, F.G., Nouzova, M., Nunes, R.D., Oliveira, R.L., Oliveira-Silveira, G., Ons, S., Pagola, L., Paiva-Silva, G.O., Pascual, A., Pavan, M.G., Pedrini, N., Peixoto, A.A., Pereira, M.H., Pike, A., Polycarpo, C., Prosdociimi, F., Ribeiro-Rodrigues, R., Robertson, H.M., Salerno, A.P., Salmon, D., Santesmasses, D., Schama, R., Seabra-Junior, E.S., Silva-Cardoso, L., Silva-Neto, M.A., Souza-Gomes, M., Sterkel, M., Taracena, M.L., Tojo, M., Tu, Z.J., Tubio, J.M., Ursic-Bedoya, R., Venancio, T.M., Walter-Nuno, A.B., Wilson, D., Warren, W.C., Wilson, R.K., Huebner, E., Dotson, E.M., Oliveira, P.L., 2015. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 14936–14941.
- Munderloh, U.G., Liu, Y., Wang, M., Chen, C., Kurtti, T.J., 1994. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Parasitol.* 80, 533–543.
- Myllymaki, H., Ramet, M., 2014. JAK/STAT pathway in *Drosophila* immunity. *Scand. J. Immunol.* 79, 377–385.
- Narasimhan, S., Rajeevan, N., Liu, L., Zhao, Y.O., Heisig, J., Pan, J., Eppler-Epstein, R., Deponte, K., Fish, D., Fikrig, E., 2014. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell Host Microbe* 15, 58–71.
- O'Dea, E., Hoffmann, A., 2010. The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000216.
- Parola, P., Paddock, C.D., Raouf, D., 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 719–756.
- Pérez de Leon, A.A., Vannier, E., Almazán, C., Krause, P.J., 2014. Tick-borne Protozoa. In: Sonenshine, D.E., Roe, M.R. (Eds.), *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York, pp. 147–179.
- Pichu, S., Ribeiro, J.M., Mather, T.N., 2009. Purification and characterization of a novel salivary antimicrobial peptide from the tick, *Ixodes scapularis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 511–515.
- Pinter, A., Labruna, M.B., 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 523–529.
- Ribeiro, J.M., Anderson, J.M., Manoukis, N.C., Meng, Z., Francischetti, I.M., 2011. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genom.* 12, 136.
- Seabra-Junior, E.S., Souza, E.M., Mesquita, R.D., 2011. Brazil.
- Severo, M.S., Sakhon, O.S., Choy, A., Stephens, K.D., Pedra, J.H., 2013. The 'ubiquitous' reality of vector immunology. *Cell. Microbiol.* 15, 1070–1078.
- Silverman, N., Zhou, R., Erlich, R.L., Hunter, M., Bernstein, E., Schneider, D., Maniatis, T., 2003. Immune activation of NF-kappaB and JNK requires *Drosophila* TAK1. *J. Biol. Chem.* 278, 48928–48934.
- Smith, A.A., Pal, U., 2014. Immunity-related genes in *Ixodes scapularis*—perspectives from genome information. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 116.
- Sonenshine, D.E., Hynes, W.L., 2008. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Frontiers in bioscience. A J. Virtual Libr.* 13, 7046–7063.
- Sonenshine, D.E., Roe, M.R., 2014. Overview: ticks, people, and animals. In: Sonenshine, D.E., Roe, M.R. (Eds.), *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York, pp. 3–16.
- Souza-Neto, J.A., Sim, S., Dimopoulos, G., 2009. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17841–17846.
- Spurgeon, S.L., Jones, R.C., Ramakrishnan, R., 2008. High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS one* 3, e1662.
- Stevens, V.L., Patel, A.V., Feigelson, H.S., Rodriguez, C., Thun, M.J., Calle, E.E., 2007. Cryopreservation of whole blood samples collected in the field for a large epidemiologic study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention. A Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored by Am. Soc. Prev. Oncol.* 16, 2160–2163.
- Sun, S.C., 2008. Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nature reviews. Immunology* 8, 501–511.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Toubiana, M., Rosani, U., Giambelluca, S., Cammarata, M., Gerdol, M., Pallavicini, A., Venier, P., Roch, P., 2014. Toll signal transduction pathway in bivalves: complete cds of intermediate elements and related gene transcription levels in hemocytes of immune stimulated *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* 45, 300–312.
- Trinchieri, G., Sher, A., 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 179–190.
- Valanne, S., Wang, J.H., Ramet, M., 2011. The *Drosophila* Toll signaling pathway. *J. Immunol.* 186, 649–656.
- Wang, P.H., Liang, J.P., Gu, Z.H., Wan, D.H., Weng, S.P., Yu, X.Q., He, J.G., 2012. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spatzle-like Toll ligands (LvSpz1-3) from *Litopenaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 359–371.
- Wang, X.W., Tan, N.S., Ho, B., Ding, J.L., 2006. Evidence for the ancient origin of the NF-kappaB/IkappaB cascade: its archaic role in pathogen infection and immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4204–4209.
- Xi, Z., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.* 4, e1000098.

Apêndice B

The transcription factor Relish controls *Anaplasma marginale* infection in the bovine tick *Rhipicephalus microplus*

Janaína Capelli-Peixoto¹, Danielle D Carvalho², Wendell C Johnson³, Glen A Scoles³,
Andrea C Fogaça¹, Massaro W Ueti^{3*#}, Sirlei Daffre^{1*#}

¹Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-900, São Paulo, State of São Paulo, Brazil.

²Department of Special Analysis, SD&W Modelagem e Soluções Estratégicas Ltda., São Paulo, State of São Paulo, Brazil.

³Animal Diseases Research Unit, USDA-ARS, Pullman, Washington, United States of America.

*Sirlei Daffre and Massaro W Ueti contributed equally to this study

Correspondent authors

Corresponding author: Tel.: +55 11 3091-7272; Fax: +55 11 3091-7417.

E-mail address: sidaffre@icb.usp.br (S Daffre).

Abstract

The tick *Rhipicephalus microplus* is an important vector of the pathogen *Anaplasma marginale*, the etiological agent of bovine anaplasmosis. The knowledge on the tick immune responses for the control of bacterial infections remains limited. In this study, we demonstrate that the transcription factor Relish from the Imd signaling pathway has an important role in the control of *A. marginale* infection in ticks. We found that the RNA-mediated silencing of Relish caused a significant increase in the number of *A. marginale* in the guts and salivary glands of *R. microplus*. In addition, Imd pathway regulates the expression of the gene that encodes the antimicrobial peptide (AMP) microplusin. Therefore, it is plausible to hypothesize that microplusin might be involved in the *A. marginale* control. This study is the first to evidence the participation of the Imd signaling pathway in the *A. marginale* control in *R. microplus*.

Keywords: *Rhipicephalus microplus*, *Anaplasma marginale*, Toll, Imd, Jak/Stat, antimicrobial peptides.

Introduction

Ticks are obligate ectoparasites, feeding on the blood of a broad number of vertebrate host. As result of the hematophagy behavior, ticks acquire a wide variety of microorganisms from the blood of hosts and transmit them to vertebrate hosts, making them important vectors of several species of protozoa, virus, and bacteria (Munderloh, 2011; Sonenshine and Roe, 2014). The tick *Rhipicephalus microplus* parasitizes cattle primarily and is responsible for considerable economic losses to livestock farming in tropical and subtropical regions of the world. The decreased production of milk and meat in the cattle herd caused by *R. microplus* results in economic losses that can reach USD 3.2 billion every year in Brazil (Grisi et al., 2014). *R. microplus* is the vector of the obligate intracellular Gram-negative bacteria *Anaplasma marginale*, which is the etiologic agent of bovine anaplasmosis. This disease causes major economic losses due to temporary infertility, miscarriages, increased mortality, and high treatment costs (Kocan et al., 2010). *R. microplus* acquires *A. marginale* via intake of infected blood in the acute and persistent phases of the disease (Galletti et al., 2009) and become reservoirs (Kocan et al., 2010). Although transovarial transmission of *A. marginale* has not been confirmed (Esteves et al., 2015), transestadial and intraestadial transmission of the bacteria has been demonstrated (Aguirre et al., 1994; Samish et al., 1993). In this context, larvae, nymphs and male ticks have a greater epidemiological importance in the transmission of *A. marginale* because their motility allows the transmission of pathogens to naive cattle (Mason and Norval, 1981, Kocan et al., 2010).

As reported for vertebrate animals, ticks, as well as other arthropods, need to defend themselves against pathogens. For this purpose, immune reactions have evolved to distinguish self from non-self and produce effectors against pathogens (Palmer and Jiggins, 2015). As observed in other invertebrates, the immune system of ticks is activated by the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), including bacterial flagella, CpG islands, lipopolysaccharides (LPS), and beta-1-3-glucans, which are recognized by pattern recognition receptors (PRR) detected to be present in various tick organs. After pathogen recognition, distinct immune responses may occur, including phagocytosis by hemocytes. This response is mediated by a complement-like system involving lectins, which contain fibrinogen-related proteins

(FREPS), thioester-containing proteins (TEPs), and other factors such as convertases. Other defense mechanisms against pathogens in ticks involve the production of reactive oxygen species, proteases, protease inhibitors, and antimicrobial peptides (Sonenshine and Hynes, 2008; Kopacek et al., 2010; Hajdusek et al., 2013; Smith and Pal, 2014).

In the fruit fly *Drosophila melanogaster*, the transcription of AMP genes is regulated by the intracellular signaling pathways Toll, Immune deficiency (Imd), and Janus kinase/signaling transducer activator of transcription (Jak/Stat). The Toll pathway is activated by Gram-positive bacteria and fungi and culminates in the production of the AMPs defensin, drosomycin, and metchnikowin whereas the Imd pathway primarily responds to infection with Gram-negative bacteria and controls the expression of other AMPs, including cecropin, attacin, drosocin, and dipterocin (Hoffmann, 2003). The Jak/Stat pathway is important in the anti-viral defense of *Drosophila* (Myllymäki and Ramet, 2014) and *Aedes aegypti* (Souza-Neto et al., 2009) and is involved in the control of the protozoan *Plasmodium* by the mosquito *Anopheles aquasalis* (Bahia et al., 2011).

Little is known about the immune system of ticks compared with the data available on the innate immunity of insects (Sonenshine and Hynes, 2008; Kopacek et al., 2010; Hajdusek et al., 2013; Smith and Pal, 2014). However, the assembly of a genomic database of *Ixodes scapularis* (Megy et al., 2012; Gulia-Nuss et al., 2016), the availability of a transcriptome database of *R. microplus* (Guerrero et al., 2005; NCBI (Biosample SAMN02463642 and Bioproject PRJNA232001)), and nucleotide sequences of other tick species deposited in Gene Bank have amplified the number of studies on the immune signaling pathways of ticks. Liu et al. (2012) showed that the Jak/Stat pathway in *I. scapularis* ticks has a crucial role in the control of *Anaplasma phagocytophilum*. This pathway is involved in the regulation of the expression of a salivary gland gene family that encode 5.3-kDa antimicrobial peptides against *A. phagocytophilum* (Liu et al., 2012). The JAK/STAT pathway of *I. scapularis* is also involved in the expression of another AMP, Dae2, which limits the proliferation of *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. In addition, it was shown that the intake of cytokine IFN-gama present in the host blood activates the JAK/STAT pathway, which in turn induces the expression of anti-*Borrelia* AMP Dae2 (Smith et al., 2016). Still in *I. scapularis*, the transcription factor Relish was involved in the regulation of the expression of subolesin (ortholog of insect akirins).

Silencing of subolesin expression by RNA interference (RNAi) in another tick, *Dermacentor variabilis*, reduced *A. marginale* infection levels in guts and salivary glands (de la Fuente et al., 2006; Naranjo et al., 2013). In addition, the Jak/Stat pathway in *I. scapularis* regulates the expression of glycoprotein peritrofin-1, which forms the peritrophic matrix in arthropods and separates the lumen from the gut epithelium. The silencing of Stat decreased the colonization of *I. scapularis* with *Borrelia burgdorferi* by decreasing the levels of peritrofin-1, indicating that colonization of the tick gut with this pathogen depend on the integrity of the peritrophic membrane (Narasimhan et al., 2014).

However, only a few studies have investigated the immune defenses of *R. microplus*. Our group has purified and characterized several AMPs, including hemocidins (Fogaça et al., 1999, Cruz et al., 2010, Belmonte et al., 2012), microplusin, defensin (Fogaça et al., 2004), and ixodidin (Fogaça et al., 2006) from *R. microplus*. Moreover, we have studied the mode of action of microplusina, which occurs through its capacity to chelate copper ions needed for bacterial respiration, a cooper dependent process (Silva et al., 2009). We have also shown that the hemocidin Hb33-61, differentially from microplusin, causes membrane permeabilization (Cruz et al., 2010). The in silico search for sequences of the signaling pathways Toll, Imd, Jnk and Jak/Stat in *R. microplus* has recently been completed. Several components of these pathways were identified, indicating the high degree of homology of pathways Toll, Jnk, and Jak/Stat among arthropods. However, some pathway components upstream of Imd, including Imd adapter and the associated proteins Fadd, Dredd, Pirk, and Dnr1, were not found in tick databases (Rosa et al, 2016).

In this study, we demonstrated that the transcription factor Relish controls the infection of the gut and salivary glands of *R. microplus* by *A. marginale*. In addition, Relish is involved in the regulation of AMP microplusin, which might be responsible by *A. marginale* infection control. In this context, the understanding of the immune system of ticks will help to elucidate the vector-pathogen interface and provide valuable data that will serve as the basis for other studies involving novel strategies for the control of vectors and bovine anaplasmosis.

Materials and Methods

Ethics Statement

All experiments involving animals were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee and the Biosafety Committee (IACUC: 2013-66, Biosafety: B-010-13) of the University of Idaho in accordance with institutional guidelines based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals developed by the U.S. National Institutes of Health (NIH).

Cattle, *A. marginale* infection and *R. microplus* male tick rearing

To obtain uninfected and unfed adult ticks, two grams of *R. microplus* (La Minita strain) larvae were placed into a cloth patch on the dorsal region of a spleen-intact naive Holstein calf aged 5–7 months (Figure 1 (1)). Previously to infestation, calf was confirmed to be negative for *A. marginale* by nested PCR (Scoles et al., 2007) and competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (Knowles et al., 1996). After 14 days, engorged nymphs were manually removed from the calf and held in an incubator at 26°C and 92% relative humidity to induce molting to adult stage. Unfed adults were sexed and males used for experiments. Four additional calves presenting the same characteristics described above were used in this study: *A. marginale*-infected calf used for acquisition feeding experiments (Figure 1 (2)): this animal was inoculated with $\sim 10^8$ *A. marginale*-infected erythrocytes (*St. Maries* strain) as described previously (Futse et al., 2003); uninfected calf used for transmission feeding (Figure 1 (3)); and two uninfected calves used for non-injected (n. i) tick group for the first feeding (Figure 1 (4)) and second feeding (Figure 1 (5)).

Double strand RNA (dsRNA) production

The genes Dorsal (KF828755), Relish (KF828760), and Stat (KF8287772) were selected for knockdown studies using RNA-mediated interference (RNAi). Primer sets for each gene were designed (Supplemental Table 1) using Primer3 software (Untergasser et al., 2012). The target fragments of DNA were amplified using complementary DNA (cDNA) produced from the *R. microplus* midgut RNA and primers containing the T7

polymerase promoter sequence. The amplified DNA fragments were purified using a PCR product purification kit (GeneJet PCR Purification Thermo Fisher Scientific, USA). dsRNAs were synthesized using the T7 Ribomax Express RNAi System (Promega) according to the manufacturer's instructions and dDNA as template. The purified dsRNA molecules were suspended in 0.1 mM EDTA, pH 8.0 (Invitrogen) (dsRNA buffer), quantified by spectrophotometry, analyzed by gel electrophoresis, and stored at -80°C until use.

Injection of ticks with dsRNA and *Anaplasma marginale* acquisition

Five cohorts of 100 freshly molted male ticks from each experimental group were injected with 10^{11} dsRNA molecules for: Dorsal (dsD), Relish (dsR), Stat (dsS) or the three dsRNAs combined (dsDRS). dsRNA was injected in the coxal membrane at the base of the fourth leg on the right ventral side using a 36-gauge needle and a Hamilton syringe coupled to a microprocessor-controlled UMP3 injection pump apparatus (World Precision Instruments, San Antonio, TX, USA) (Bastos et al., 2009). The control group was injected with dsRNA buffer. After injection, male ticks were immediately transferred to patches placed on an infected calf (Figure 1 (2)). After 7 days of acquisition feeding during peak bacteremia, ticks were removed and transferred to an uninfected calf (Figure 1 (3)), where they were allowed to feed for 5 days for transmission feeding. Another group of 100 freshly molted and non-injected (n.i.) males were allowed to feed on two uninfected calves (Figure 1 (4 and 5)) following the procedure described above. The survival rate was calculated by the number of attached ticks divided by the total number of ticks placed on the calves (98-100 ticks). Tick gut and salivary glands were dissected after 12 days of blood feeding. Each biological replicate corresponds to organs from two males. The samples were kept at -80°C until the RNA and DNA extraction.

RNA and DNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA and genomic DNA were extracted using TRIzol® reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA were treated with DNase I (Ambion) to eliminate contaminating genomic DNA. RNA concentration was determined in a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). cDNA was

synthesized using 345 ng of purified total RNA as template in a 20 μ L reaction volume containing 2.5 μ M oligo(dT)₁₂₋₁₈, 0.5 mM of dNTPs, 5 mM of DTT, 2 units of RNaseOUT ribonuclease, and 10 units of SuperScript III reverse transcriptase, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

Quantitative PCR (qPCR)

The gene expression was quantified by qPCR on a CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The amplification reaction was performed in two technical replicates in a final volume of 15 μ l using 10 mM of specific primers (Table 1), 1 μ l of cDNA as template and Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA). The qPCR conditions consisted of an initial cycle at 95°C for 10 min for denaturation, followed by 55 cycles at 95°C for 15 s for denaturation, 60°C for 30 s for annealing, and 72°C for 30 s for extension. The specificity of the qPCR amplification products was determined via melting curve analysis by measuring the levels of fluorescence between 60°C and 95°C, with increments of 0.5°C. Gene expression data were analyzed using the CFX Manager Software (Bio-Rad) to obtain threshold cycle (Ct) values. The 40S ribosomal protein S3a (Supplemental Table 1) was used as the endogenous reference gene. Expression data were normalized using the mean Ct values of the reference gene using the $2^{(-\Delta\Delta C(t))}$ method, as described by Livak and Schmittgen (2001). The results were presented as changes in relative gene expression in organs of experimental in relations to control groups.

The total number of *A. marginale* in tick gut and salivary glands was quantified by qPCR using genomic DNA as template, specific primers (Supplemental Table 1), and a TaqMan probe that targeted *msp5*, as detailed by Bifano et al., (2014).

Statistical Analysis

The statistical significance of the differences in the levels of gene expression between the experimental and control groups was evaluated using IBM SPSS software version 2.0. Extreme values (points that were distant more than 3 interquartile ranges below the first quartile and above the third quartile) were identified and excluded from the analysis. The Kruskal-Wallis test was used to assess similarities between the groups

evaluated, and the Mann-Whitney U test with Bonferroni correction was used to compare the median values. A p-value of less than 0.05 ($P < 0.05$) was considered statistically significant.

Results

***A. marginale* modulates the gene expression of transcription factors and antimicrobial peptides**

The innate immune response is the first line of defense against microbial infections in animals. Toll, Imd, and Jak/Stat signaling pathways represent the major signaling pathways involved in innate immunity in arthropods and participate in the activation of the expression of several immune effectors, including AMPs (Palmer and Jiggins, 2015). In the presence of the bacterium *A. marginale*, the expression of transcription factor of Toll pathway, Dorsal, is downregulated in the gut and salivary glands of *R. microplus* whereas the expression of Relish and Stat was not modulated (Figure 2A and B).

The relative expression of microplusin increased expressively in the guts (Figure 2C) and salivary glands (Figure 2D) after infection with *A. marginale*. The genes that encode defensin and lysozyme were down-regulated in the guts, but not in salivary glands (Figure 2C). The expression of ixodidin gene was not modulated by *A. marginale* infection in neither guts or salivary glands (Figure 2C and D).

Relish is involved in the control of infection with *A. marginale*

In this study, we assessed whether the disruption of Toll, Imd, and Jak/Stat signaling pathways in male would interfere with *A. marginale* acquisition. For this, their respective transcription factors, Dorsal (D), Relish (R), and Stat (S) were used in RNAi experiments. The injection of the dsD, dsR, dsS or the triple dsRNA (dsDRS) promoted a significant increase in the number of *A. marginale* in both the gut and salivary glands in *R. microplus* ticks (Figure 3A and B).

The efficiency of gene silencing of ticks injected with dsD, dsR, dsS, or dsDRS is shown in Figure 4. Interestingly, we observed that gene silencing was not specific for treatment with dsD and dsS (Figures 4A-C), in contrast to the silencing achieved with

dsR. The expression of Relish significantly decreased in the guts and salivary glands of ticks injected with dsR (Figures 4A and 4B), and the level of silencing reached 91% (Figure 4C). The relative expression of Relish also decreased in the gut and salivary glands of ticks injected with dsD, dsS or dsDRS. However, the decrease in expression was not significant in the gut of ticks injected with dsD (Figure 4A-C).

The rate of tick survival of the five *A. marginale*-infected tick groups which were injected with dsRNA or control after first feeding varied between 25,5% and 52%, whereas the survival rate in the non- injected (n.i) group was approximately 60%. (Table 1). The surviving ticks were allowed to second feeding on naïve calf for more five days. At the end of the second feeding, the survival rates were higher than after the first feeding for all groups (85-95% for n.i. group and 82-90% for injected ticks). The tick death observed in the first feeding could be due to the fragility of freshly molted adult ticks. In addition, the injection procedure was probably the reason for the lower rate observed in the injected ticks compared to n.i. group.

Regulation of AMPs by Relish and Stat

The relative expression of microplusin was down-regulated in the gut and salivary glands after treatment with dsR, dsS, and dsDRS (Figure 5A). The results of the silencing of Relish in ticks treated with dsR, dsS, and dsDRS suggest that the expression of microplusin might be regulated by Relish (Figure 4). In dsD group, the expression of microplusin was not modulated probably because of the low percentage of Relish silencing in the guts (35%), but it was observed a tendency of downregulation in the salivary glands (Figure 4).

The relative expression of ixodidin, defensin, and lysozyme decreased in the salivary glands of ticks treated with dsS (Figures 5B-D). Considering that dsR silenced Relish alone, that dsS silenced Relish and Stat (Figure 4), and that gene expression was not modulated in ticks treated with dsR (Figure 5), we hypothesized that the Jak/Stat pathway might regulate the expression of these three AMPs.

Discussion

The survival, development, and multiplication of *A. marginale* in the gut cells and salivary glands of *R. microplus* depends on the molecular interactions between this bacterium and its biological vector (Zivkovic et al., 2010). These two organs are barriers against the development of *A. marginale* within the tick (Ueti et al., 2007). The gut is the initial site of interaction between ticks and pathogens and is probably the most important organ for pathogen survival and proliferation (Hajdusek et al., 2013), whereas the salivary glands are the primary site of transmission of pathogens to the vertebrate host (Kaufman, 2010). We observed that *A. marginale* induced the gene expression of microplusin in these two organs (Figure 1C and D). The upregulation of microplusin was also observed in *Amblyomma sculptum* and *A. aureolatum* ticks infected with *R. rickettsii* (Fogaça A. C., personal communication). In contrast, the transcript levels of two other AMPs, lysozyme and defensin, decreased in the guts of infected *R. microplus* ticks (Figure 1C). Furthermore, the transcription factor Dorsal was downregulated in both gut and salivary glands (Figure 1A and B). The modulation of immune-related signaling pathways and the consequent synthesis of AMPs can be due to the response of ticks to bacterial infection to control bacteremia in these tissues or a response of bacteria to promote their survival. Our research group has observed a significant decrease in the expression of genes that compose the Toll, Imd, and Jak/Stat pathways in the *R. microplus* cell line BME26 infected with *A. marginale*. On the contrary, the challenge with other pathogens, including *R. rickettsii*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, and *Saccharomyces cerevisiae* induced immune pathway components (Rosa et al., 2016).

Understanding how signaling pathways Toll, Imd, and Jak/Stat respond to infection is essential to elucidate the immune response of vectors and the interaction between ticks and pathogens. Our results showed that Relish dsRNA specifically silenced its target gene. A result of Relish knockdown, a higher number of *A. marginale* was observed within the guts and salivary glands (Figures 3 and 4). The relative expression of Relish was also significantly decreased in the experimental group injected with dsD, dsS, and dsDRS, which may explain the higher bacterial load observed in these groups. Because treatment with dsD and dsS did not specifically silence their respective genes, we could not infer

the importance of Toll and Jak/Stat pathways in the control of *A. marginale* by *R. microplus*.

To the best of our knowledge, no previous studies have evaluated the gene silencing of transcription factors Toll, Imd, and Jak/Stat after treatment with their corresponding dsRNAs. In addition, the non-specific silencing of genes that encode the transcription factors involved in signaling pathways has not been previously reported in arthropod immune system literature. We raised the following hypotheses to explain our results: 1) off-target effect and 2) cross-talk between the signaling pathways.

The off-target effect, is a limitation of the RNA interference technique, corresponding to the recognition of random mRNAs with partial similarity with target mRNAs by small interfering RNAs (siRNAs) (Franca et al., 2010). Although we did not detect a significant homology between genes Dorsal, Relish, and Stat using BLAST (data not shown), we cannot discard the possibility of off-target effects in the silencing experiments.

The other hypothesis is the crosstalk between the signaling pathways. Crosstalk is the ability of components of a particular signaling pathway to affect the components of another pathway, or a “cross-activation”, with actions on separate targets, but in the end, producing an identical action with a single effector (Calil et al., 2007). For instance, crosstalk occurs between Imd and Toll pathways in *Drosophila*. The adapter protein Fadd, which binds Imd and Dredd in the IMD pathway, can also interact with MyD88 from the Toll pathway (Horng and Medzhitov, 2001). In mammalian cells, crosstalk may occur in various ways. The first is the recognition of the same PAMP by two or more distinct receptors. For instance, flagellin can be recognized by either TLR5 or NLRC4 receptors, which are located in different cellular compartments (TLR5 is expressed on the cell surface whereas NLRC4 is expressed in the cytoplasm). The recognition of flagellin by TLR5 activates the MyD88-dependent Toll pathway and lead to translocation of the NF- κ B factor to the nucleus, whereas NLRC4 activates caspases and induces the synthesis of interleukin 1 β (Hayashi et al., 2001; Franchi et al., 2006). Similarly, viral dsRNA is recognized by either TLR3, a surface receptor that binds extracellular RNA, or RIG-I, which binds cytoplasmic RNA (Kagan and Barton, 2014). The second type of crosstalk involves the regulation of effector pathways. Several signaling pathways can induce

identical innate immune responses. For instance, in mammals, signaling via TLR3, RIG-I, MAVS, CGA, STING, or IFI16 induces the expression of type I IFN. Therefore, the simultaneous activation of more than one receptor may enhance the induction of the same effector (Thaiss et al., 2016). As observed in *Drosophila* and mammals, here we show that the crosstalk between signaling pathways may occur in ticks. The assumption of the existence of crosstalk between signaling pathways seems quite plausible because it serves to enhance the immune response to a stimulus. An evidence that strengthens the possibility of crosstalk between the signaling pathways is the absence of some components of the Imd signaling pathway. No sequence homologous to the intracellular protein Imd or proteins that interact with it (Fadd, Pirk, Dnr1, and caspase Dredd) were found in ticks (Rosa et al., 2016; Palmer and Jiggins, 2015). Therefore, it is possible that intermediate components of the Imd pathway assume the role of the Imd protein and other missing components, or that Relish may be activated via crosstalk between molecules of the Imd and Toll pathways. One strategy that can be used to test the hypothesis of crosstalk is to silence one pathway and assess whether another pathway regulated the expression of effectors that are specific to the silenced pathway. However, one of the limitations of this study was the lack of identification of these specific factors, considering that, with the exception of Relish, the silencing of the transcription factors of the Toll and Jak/Stat pathways was not specific. We also observed the non-specific silencing of transcription factors in the cell line BME26 model, as discussed in the next chapter of this thesis ("Functional characterization of the signaling pathways in the cell line BME26 from the cattle tick *Rhipicephalus microplus*").

The specific silencing of Relish by dsR suggests that microplusin (Figure 5A) is regulated by this transcription factor. However, we cannot discard the possibility that microplusin is also regulated by the Jak/Stat pathway because the relative expression of microplusin decreased in ticks treated with dsS (Figure 5A), although this treatment silenced both Relish and Stat (Figure 4). It was previously shown that both Dorsal and Relish can independently induce the expression of cecropin, defensin, and gambicin in *Anopheles* sp. (Luna et al., 2006; Garver et al., 2009).

It is possible that *R. microplus* male ticks control *A. marginale* infection in the gut and salivary glands via expression of microplusin, which is regulated by Relish.

Future studies to assess the effect of AMPs on the bacterial infection are warranted. The role played by immune components on the control of other pathogens transmitted by *R. microplus*, including *Babesia bovis* and *B. bigemina*, the etiological agents of bovine babesiosis, is also warranted and may provide novel strategies for the control ticks and their pathogens.

Acknowledgments

We are grateful to Ralph Horn and James Allison for their assistance with the animals, and Dr. Donald Knowles for his scientific support. This study was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) under grant Nos. 2011/23549-2 and 2013/25213-7, and U.S. Department of Agriculture, under grant ARS 5348-32000-033-00D.

Figures:

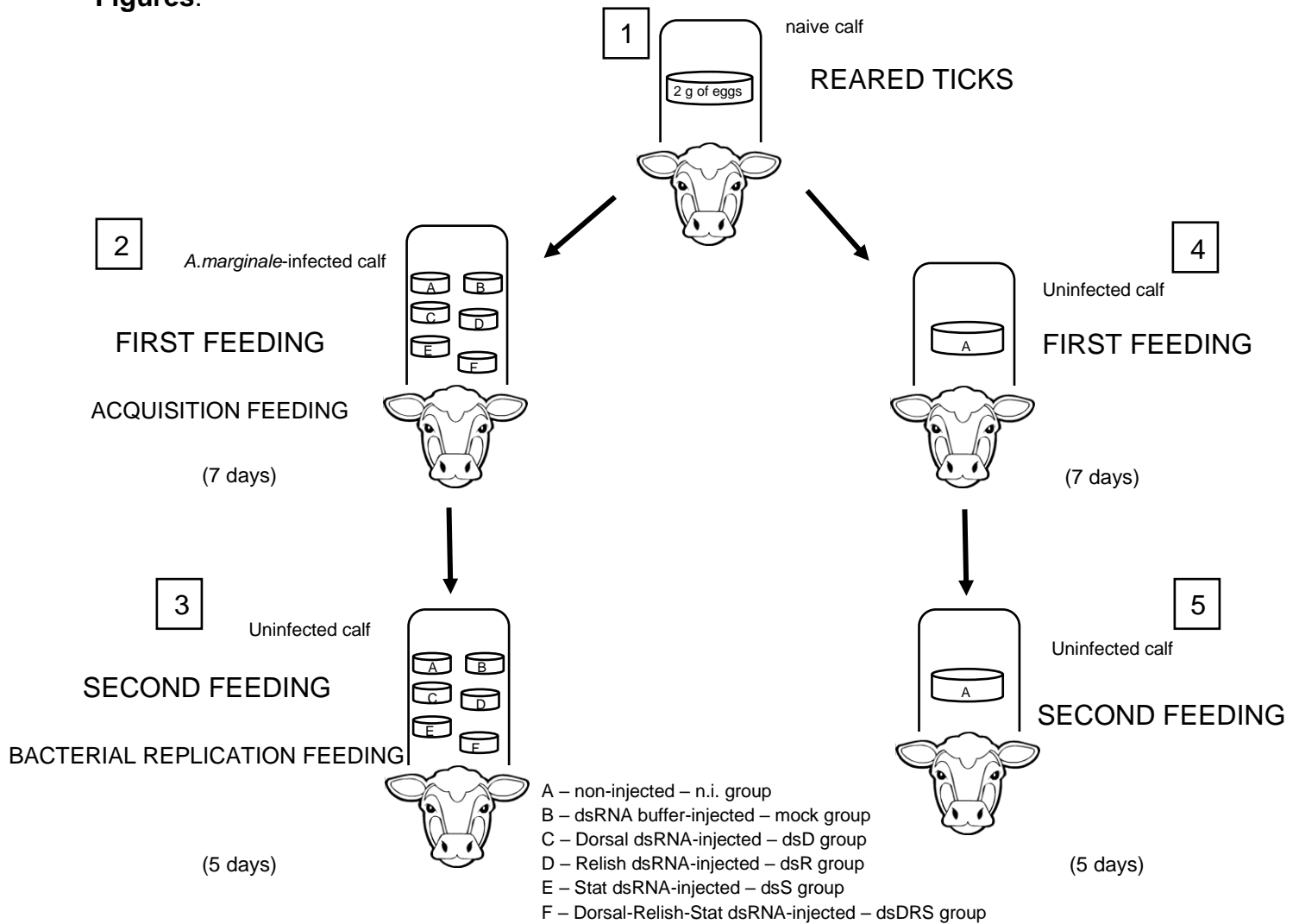
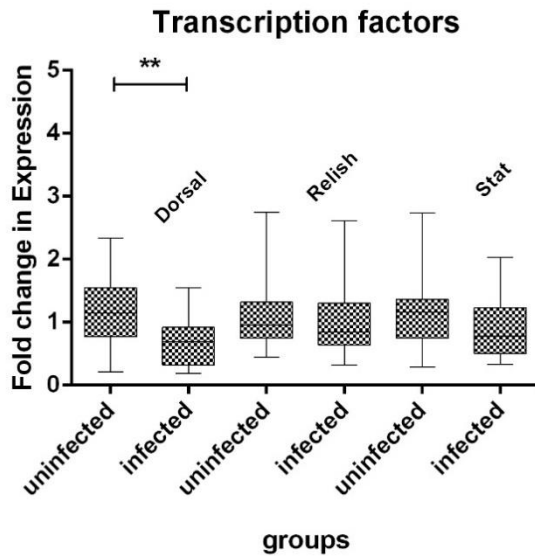
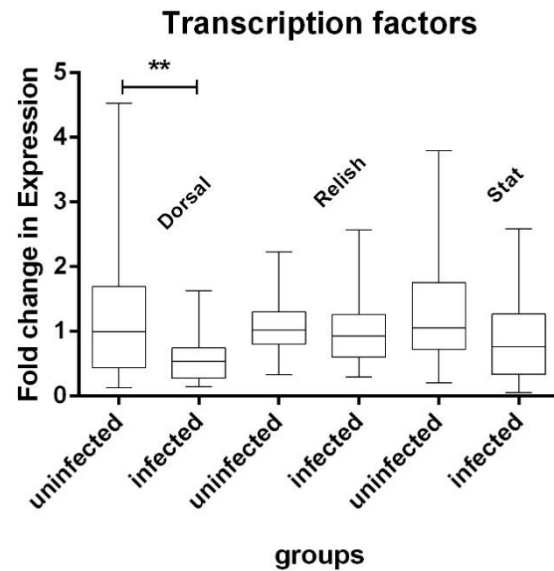


Figure 1. Experimental design of the distribution of tick groups (A-F) on *A. marginale*-infected (2) and uninfected calves (3-5).

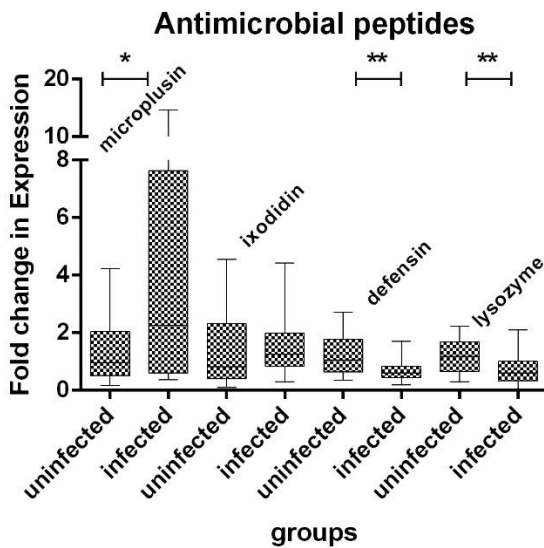
A



B



C



D

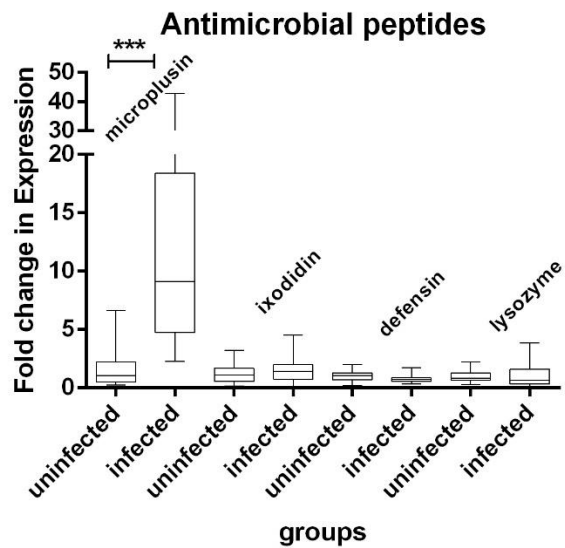


Figure 2. Tick gene expression modulation by *A. marginale* infection. The gene expression of the transcription factors Dorsal, Relish, and Stat in the guts (A) and salivary glands (B) and the AMPs microplusin, ixodidin, defensin, and lysozyme in the guts (C) and salivary glands (D) from males fed for 12 days on either in uninfected or *A. marginale*-infected calves was assessed by RT-qPCR. Threshold values were normalized according to the Ct of the reference gene (S3a ribosomal). The relative expression level of each gene in infected ticks in relation to uninfected ticks (control) was calculated using $2^{-(\Delta\Delta C(t))}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The data represent the median of 16 – 26

pools of two guts or salivary gland pairs. The statistical tests Kruskal-Wallis and Mann-Whitney were used. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

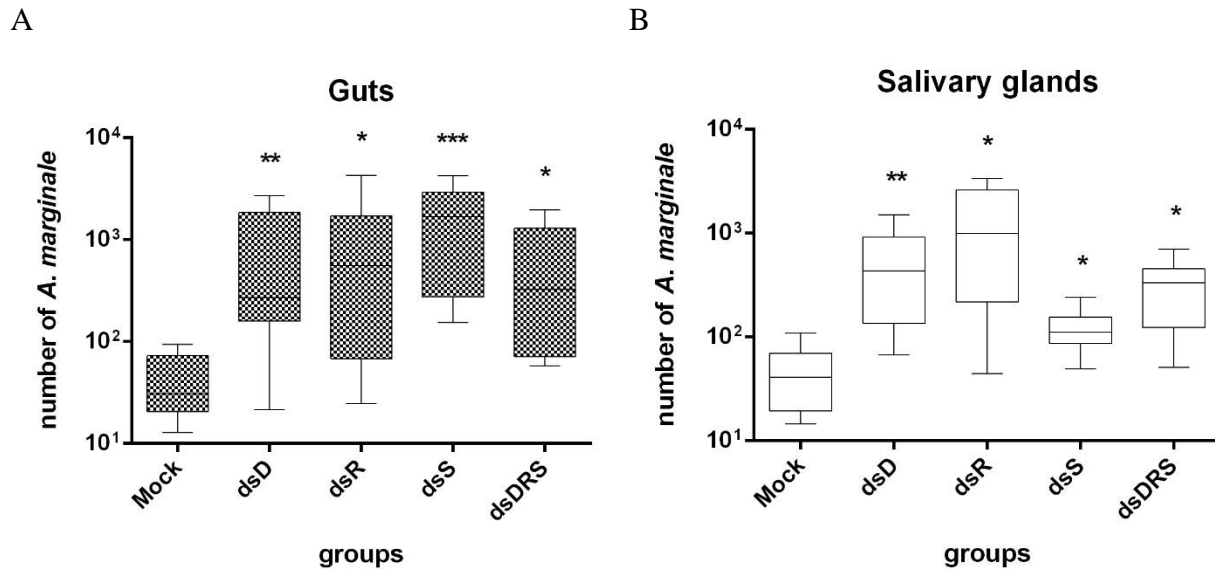
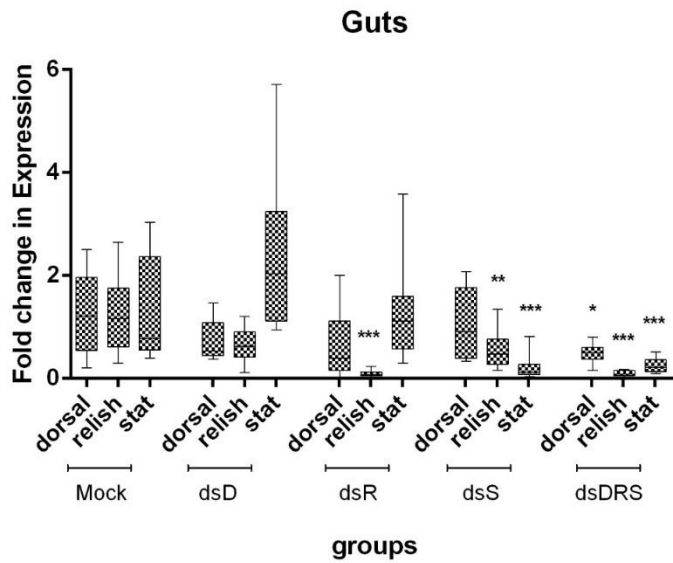
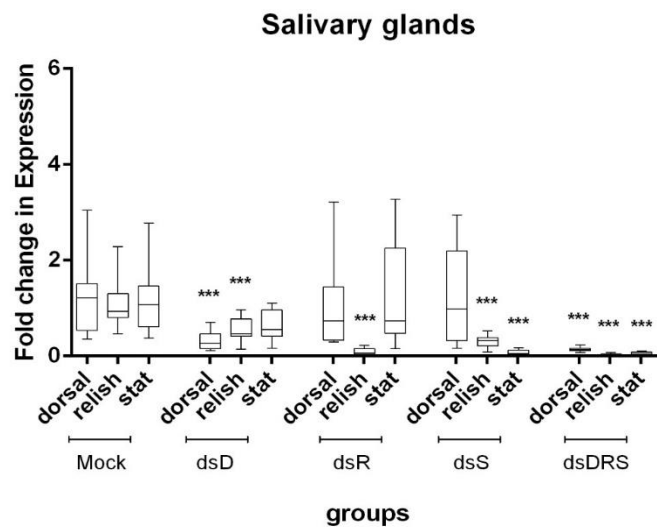


Figure 3. *A. marginale* loads on dsRNA-injected tick in the guts (A) and salivary glands (B). The bacteria number was determined by qPCR using specific primers and a TaqMan probe for *msp5* gene. The data represent the median of 6 – 13 pools of 2 guts or salivary gland pairs. The statistical tests Kruskal-Wallis and Mann-Whitney were used. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. dsD: dsRNA Dorsal, dsR: dsRNA Relish, dsS: dsRNA Stat, dsDRS: dsRNA Dorsal+Relish+Stat and Mock: ticks injected with dsRNA buffer.

A



B



C

	dsD		dsR		dsS		dsDRS	
	G	SG	G	SG	G	SG	G	SG
Dorsal	n.m	66,9%±18	n.m	n.m	n.m	n.m	51,8%±18	86%±4
Relish	n.m	44,4%±25	90,8%±5,7	91,2%±6,7	45%±30,6	68,6%±13	90,2%±5,6	96,8%±1,9
Stat	n.m	n.m	n.m	n.m	78,6%±20	89%±15	74,7%±13,6	94,5%±3,2

Figure 4. Gene knockdown efficiency. The gene expression of the transcription factors Dorsal, Relish and Stat genes in guts (A) and salivary glands (B) from dsRNA-injected ticks (dsD, dsR, dsS and dsDRS) and dsRNA buffer-injected ticks (mock) was evaluated by RT-qPCR. Threshold values were normalized according to the Ct of the reference gene (S3a ribosomal). The relative expression level of each gene in dsRNA-injected ticks

in relation to mock ticks was calculated using $2^{(-\Delta\Delta C(t))}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The data represent the median of 11 – 22 pools of two guts or salivary glands. The statistical tests Kruskal-Wallis and Mann-Whitney were used. * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001. The percentage of gene silencing efficiency in guts (G) and salivary glands (SG) is shown in the panel C. dsD: dsRNA Dorsal, dsR: dsRNA Relish, dsS: dsRNA Stat, dsDRS: dsRNA Dorsal+Relish+Stat, Mock: ticks injected with dsRNA buffer and n.m: not modulated.

Table 1: Survival rate of ticks.

Injected ticks		
dsRNA	First feeding	Second feeding
dsD	31.0% (31 ^a /100 ^b)	83.8% (26 ^a /31 ^b)
dsR	33.0% (33 ^a /100 ^b)	81.8% (27 ^a /33 ^b)
dsS	52.0% (52 ^a /100 ^b)	90.4% (47 ^a /52 ^b)
dsDRS	25.5% (25 ^a /98 ^b)	88.0% (22 ^a /25 ^b)
dsRNA buffer (Mock)	51.0% (51 ^a /100 ^b)	86.2% (44 ^a /51 ^b)
Non-injected ticks		
Uninfected ticks	60.0% (60 ^a /100 ^b)	85.0% (51 ^a /60 ^b)
<i>A.marginale</i> -infected ticks	59.0% (59 ^a /100 ^b)	94.9% (56 ^a /59 ^b)

Survival rates were calculated by the number of attached ticks (a) /number of ticks placed in calves (b). dsD: dsRNA Dorsal, dsR: dsRNA Relish, dsS: dsRNA Stat, dsDRS: dsRNA Dorsal+Relish+Stat.

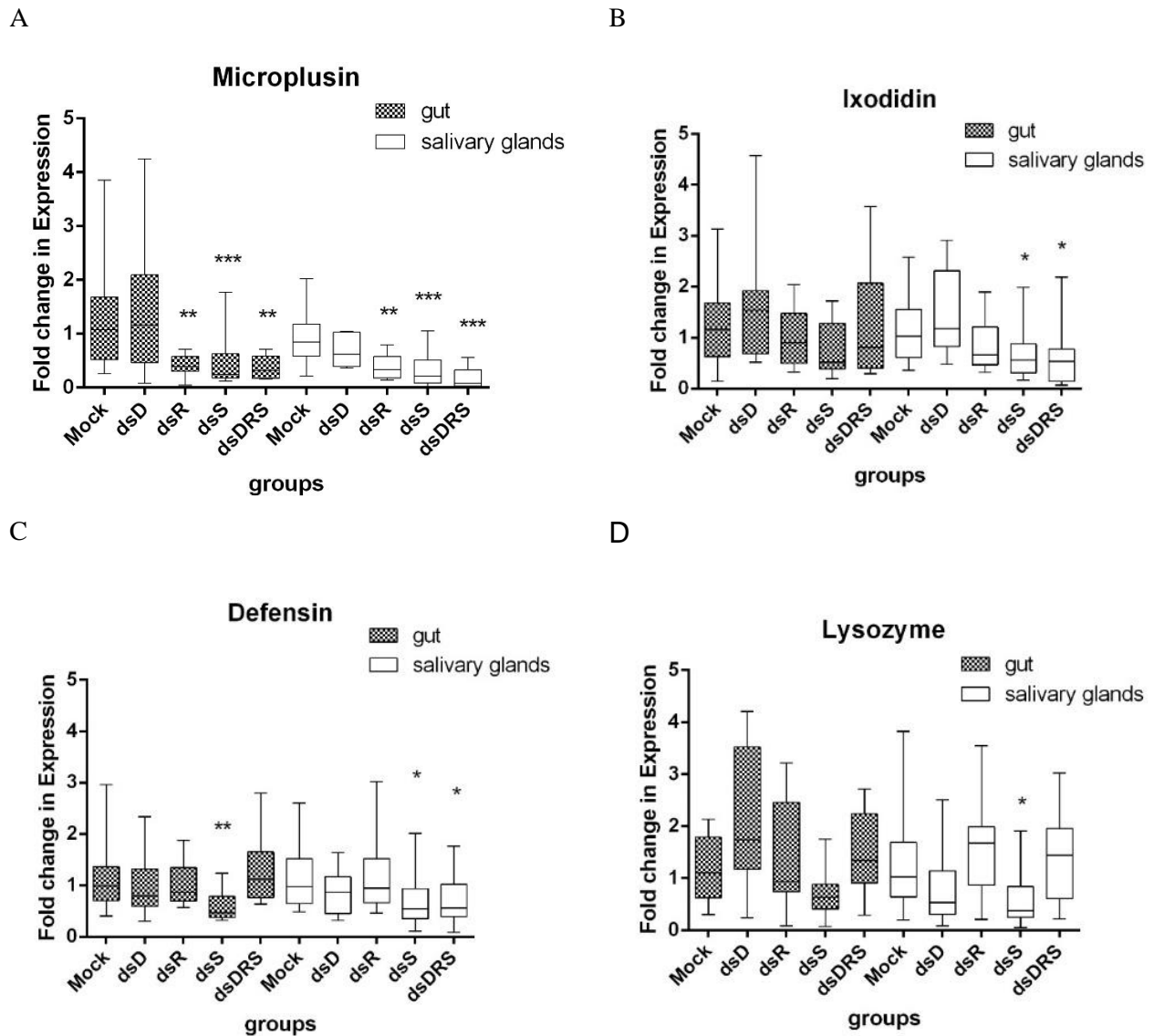


Figure 5. Relative gene expression of the AMPs microplusin (A) ixodidin (B), defensin (C), and lysozyme (D) in the guts and salivary glands from *R. microplus* males fed on *A. marginale*-infected calves was assessed by RT-qPCR. Threshold values were normalized according to the Ct of the reference gene (S3a ribosomal). The relative expression level of each gene in dsRNA-injected ticks in relation to mock was calculated using $2^{(-\Delta\Delta C(t))}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The data represent the median of 10 – 22 pools of two guts or salivary glands. The statistical tests Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used. * P < 0.05, and ** P < 0.01. dsD: dsRNA Dorsal, dsR: dsRNA Relish, dsS: dsRNA Stat, dsDRS: dsRNA Dorsal+Relish+Stat and Mock: ticks injected with dsRNA buffer.

Supplementary information

Table 1: Primers used in this study.

Database/number	Gene	Functional annotation	Primer-Fw (5'-3')	Primer-Rv (5'-3')	Amplicon (bp)
GenBank/CV443892	40S ribosomal protein S3a	Reference gene	GGACGACCGATGGCTACCT	TGAGTTGATTGGCGCACTTCT	69
GenBank/AY233212	Microplusin	AMP	CAGTGAAGCCTTCGCATCAG	CCGAAGTCGAAGCCACAAG	120
GenBank/AY233213	Defensin	AMP	GATGCCCGTTTAACCAAGGA	TTGATTAGGCCAGCGCAGTA	82
GenBank/P83516.2	Ixodidin	AMP	CAAAATGCAGTCCCGTTACGT	CCACGACGGCAGAAGCATCC	210
TIGR/TC21088	Lysozyme	AMP	AAACGACGACATCACTGACG	TGTAGTTGACTCCTCTGCAG	107
GenBank/KF828755	Dorsal	Toll pathway	CATATCGGGTACATCCACAC	GGCTTGTAAGGTGCATGTC	102
	dsRNA Dorsal		TAATACGACTCACTATAGGCT TGTGGCAAGGAAGGCTG	TAATACGACTCACTATAGGC GTCCTCCTCAAACCACAC	434
GenBank/KF828760	Relish	Imd pathway	GCACGACAGCCAATTATTCG	CTCTTGCTCAGCAGAAGAAG	139
	dsRNA Relish		TAATACGACTCACTATAGGCT TCTTCTTGCTGAGC	TAATACGACTCACTATAGGA GACGATAGACATGCTGG	454
GenBank/KF828772	STAT	Jak/Stat pathway	TAGTGTTCAGGTTTGGACG	CCGTCGACAGCTTAACTTC	195
	dsRNA STAT		TAATACGACTCACTATAGGCA CAGTAACCTGGGACAATG	TAATACGACTCACTATAGGC GCGGGTGACTTTCATGATG	296
GenBank/KP347554	MSP5	<i>A. marginale</i> surface	CTTCCGAAGTTGTAAGTGAGG GCA	CTTATCGGCATGGTCGCCTA GTTT	203
	MSP5 – hydrolysis probe		(56-FAM/GCCTCCGCGTCTTTCACAATTTGGT/3BHQ_1).	-	

References

- Aguirre DH, Gaido AB, Vinabal AE, Echaide ST, Guglielmone AA. 1994. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. *Parasite*. 1(4):405-7.
- Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Araujo HR, Guedes BA, Orfano AS, Tadei WP, Rios-Velasquez CM, Han YS, Secundino NF, Barillas-Mury C, Pimenta PF, Traub-Cseko YM. 2011. The JAK-STAT pathway controls *Plasmodium vivax* load in early stages of *Anopheles aquasalis* infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 5(11):e1317.
- Bastos RG, Ueti MW, Guerrero FD, Knowles DP, Scoles GA. 2009. Silencing of a putative immunophilin gene in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* increases the infection rate of *Babesia bovis* in larval progeny. *Parasites & Vectors*. 2(1):57.
- Belmonte R, Cruz C, Pires J, Daffre S. 2012. Purification and characterization of Hb 98-114: A novel hemoglobin-derived antimicrobial peptide from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Peptides*. 37(1):120–27.
- Bifano TD, Ueti MW, Esteves E, Reif KE, Braz GR, Scoles GA, Bastos RG, White SN, Daffre S. 2014. Knockdown of the *Rhipicephalus microplus* cytochrome c oxidase subunit III gene is associated with a failure of *Anaplasma marginale* transmission. *PLoS ONE*. 9(5):e98614.
- Calil I, Tineli RA, Vicente WVA, Rodrigues AJ, Evora PRB. 2007. O conceito de crosstalk e suas implicações para função cardiovascular e doença. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 88(1): e26-e31.
- Cruz CE, Fogaca AC, Nakayasu ES, Angeli CB, Belmonte R, Almeida IC, Miranda A, Miranda MT, Tanaka AS, Braz GR, Craik CS, Schneider E, Caffrey CR, Daffre S. 2010. Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. *Parasites & Vectors*. 3:63.
- de la Fuente J, Almazán C, Blouin EF, Naranjo V, Kocan KM. 2006. Reduction of tick infections with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* by targeting the tick protective antigen subolesin. *Parasitology Research*. 100(1):85-91.
- Esteves E, Pohl PC, Klafke GM, Reck J, Fogaça AC, Martins JR, Daffre S. 2015. Low temperature affects cattle tick reproduction but does not lead to transovarial transmission of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*. 214(3-4):322-6.
- Fogaça AC, da Silva PI Jr, Miranda MT, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PE, Daffre S. 1999. Antimicrobial Activity of a Bovine Hemoglobin Fragment in the Tick *Boophilus microplus*. *Journal of Biological Chemistry*. 274(36):25330–34.

Fogaça AC, Lorenzini DM, Kaku LM, Esteves E, Bulet P, Daffre S. 2004. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental & Comparative Immunology*. 28(3):191-200.

Fogaça AC, Almeida I, Eberlin M, Tanaka A, Bulet P, Daffre S. 2006. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides*. 27(4):667–74.

Franca NR, Mesquita Júnior D, Lima AB, Pucci FVC, Andrade LEC, Silva NP. 2010. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 50(6):695-709.

Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozören N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Núñez G. 2006. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nature Immunology*. 7(6):576-82.

Futse JE, Ueti MW, Knowles DP, Palmer GP. 2003. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: Retention of Vector Competence in the Absence of Vector-Pathogen Interaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(8):3829-34.

Galletti MFBM, Ueti MW, Knowles DP, Brayton KA, Palmer GH. 2009. Independence of *Anaplasma marginale* strains with high and low transmission efficiencies in the tick vector following simultaneous acquisition by feeding on a superinfected mammalian reservoir host. *Infection and Immunity*. 77(4):1459-64.

Garver LS, Dong Y, Dimopoulos G. 2009. Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. *PLoS Pathogen*. 5(3):e1000335.

Grisi L, Leite RC, Martins JR, Barros AT, Andreotti R, Cancado PH, Leon AA, Pereira JB, Villela HS. 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Órgão Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria* 23, 150-156.

Guerrero F, Miller R, Rousseau M, Sunkara S, Quackenbush J, Lee Y, Nene V. 2005. BmiGl: A database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 35(6):585-95.

Gulia-Nuss M, Nuss AB, Meyer JM, Sonenshine DE, Roe RM, Waterhouse RM, Sattelle DB, de la Fuente J, Ribeiro JM, Megy K, Thimmapuram J, Miller JR, Walenz BP, Koren S, Hostetler JB, Thiagarajan M, Joardar VS, Hannick LI, Bidwell S, Hammond MP, Young S, Zeng Q, Abrudan JL, Almeida FC, Ayllón N, Bhide K, Bissinger BW, Bonzon-Kulichenko E, Buckingham SD, Caffrey DR, Caimano MJ, Croset V, Driscoll T, Gilbert D, Gillespie JJ, Giraldo-Calderón GI, Grabowski JM, Jiang D, Khalil SM, Kim D, Kocan KM,

Koči J, Kuhn RJ, Kurtti TJ, Lees K, Lang EG, Kennedy RC, Kwon H, Perera R, Qi Y, Radolf JD, Sakamoto JM, Sánchez-Gracia A, Severo MS, Silverman N, Šimo L, Tojo M, Tornador C, Van Zee JP, Vázquez J, Vieira FG, Villar M, Wespiser AR, Yang Y, Zhu J, Arensburger P, Pietrantonio PV, Barker SC, Shao R, Zdobnov EM, Hauser F, Grimmekhuijzen CJ, Park Y, Rozas J, Benton R, Pedra JH, Nelson DR, Unger MF, Tubio JM, Tu Z, Robertson HM, Shumway M, Sutton G, Wortman JR, Lawson D, Wikel SK, Nene VM, Fraser CM, Collins FH, Birren B, Nelson KE, Caler E, Hill CA. 2016. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nature communications*. 7, 10507.

Hajdusek O, Sima R, Ayllon N, Jalovecka M, Perner J, de la Fuente J, Kopacek P. 2013. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 3:26.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 410(6832):1099-103.

Hoffman JA. 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 426:33 – 38.

Hornig T, Medzhitov R. 2001. *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *PNAS*. 98(22):12654-8.

Kagan JC, Barton GM. 2014. Emerging principles governing signal transduction by pattern-recognition receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 7(3):a016253.

Kaufman WR. 2010. Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 1:11–22.

Knowles D, Torioni de Echaide S, Palmer G, McGuire T, Stiller D, McElwain T. 1996. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:2225–2230.

Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*. 167:95-107.

Kopacek P, Hajdusek O, Buresova V, Daffre S. 2010. Tick innate immunity. *Advances in experimental medicine and biology*. 708:137-162.

Liu L, Dai J, Zhao YO, Narasimhan S, Yang Y, Zhang L, Fikrig E. 2012. *Ixodes scapularis* JAK-STAT pathway regulates tick antimicrobial peptides, thereby controlling the agent of human granulocytic anaplasmosis. *The Journal of infectious diseases*. 206:1233-1241.

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

Luna C, Hoa NT, Lin H, Zhang L, Nguyen HL, Kanzok SM, Zheng L. 2006. Expression of immune responsive genes in cell lines from two different Anopheline species. *Insect Molecular Biology*. 15(6):721-9.

Mason CA, Norval RAI. 1981. The transfer of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) from infested to uninfested cattle under field conditions. *Veterinary Parasitology*. 8:185–188.

Megy K, Emrich SJ, Lawson D, Campbell D, Dialynas E, Hughes DS, et al. 2012. VectorBase: improvements to a bioinformatics resource for invertebrate vector genomics. *Nucleic Acids Research*. 40:D729–D734

Myllymaki H, Ramet M. 2014. JAK/STAT pathway in *Drosophila* immunity. *Scandinavian journal of immunology*. 79:377-385.

Munderloh U. 2011. Emerging and reemerging tick-borne infections: genetic manipulation of intracellular tick-borne pathogens. Critical needs and gaps in understanding prevention, amelioration, and resolution of Lyme and other tick-borne diseases: The Short-Term and Long-Term Outcomes: Workshop Report. The National Academies Press, Washington D.C., p. 38 – 41.

Naranjo V, Ayllón N, Pérez de la Lastra JM, Galindo RC, Kocan KM, Blouin EF, Mitra R, Alberdi P, Villar M, de la Fuente J. 2013. Reciprocal regulation of NF-κB (Relish) and Subolesin in the tick vector, *Ixodes scapularis*. *PLoS One*. 8(6):e65915.

Narasimhan S, Rajeevan N, Liu L, Zhao YO, Heisig J, Pan J, Eppler-Epstein R, Deponte K, Fish D, Fikrig E. 2014. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the lyme disease spirochete. *Cell host & microbe*. 15:58-71.

Palmer WJ, Jiggins FM. 2015. Comparative Genomics Reveals the Origins and Diversity of Arthropod Immune Systems. *Molecular Biology and Evolution*. 32(8):2111-29.

Rosa RD, Capelli-Peixoto J, Mesquita RD, Kalil SP, Pohl PC, Braz GR, Fogaça AC, Daffre S. 2016. Exploring the immune signaling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: from molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. *Developmental and Comparative Immunology*. 59:1-14.

Samish M, Pipano E, Hadani A 1993. Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus annulatus* ticks in cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 54(3): 411-414. 9.

Scoles GA, Ueti MW, Noh SM, Knowles DP, Palmer GH. 2007. Conservation of transmission phenotype of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains among *Dermacentor* and *Rhipicephalus* ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 44(3):484-491.

Silva F, Rezende C, Rossi D, Esteves E, Dyszy F, Schreier S, Daffre S. 2009. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal of Biological Chemistry*. 284(50): 34735-46.

Smith AA, Pal U. 2014. Immunity-related genes in *Ixodes scapularis* - perspectives from genome information. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4:116.

Smith, A. A.; Navasa, N.; Yang, X.; Wilder, C. N.; Buyuktanir, O.; Marques, A.; Anguita, J.; Pal, U. 2016. Cross-Species Interferon Signaling Boosts Microbicidal Activity within the Tick Vector. *Cell Host Microbe*. 20(1):91-8.

Sonenshine DE, Hynes WL. 2008. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Frontiers in Bioscience*.13:7046-63.

Sonenshine DE, Roe MR. 2014. Overview: ticks, people, and animals. In: Sonenshine D.E., Roe, M.R. (Eds.), *Biology of ticks*. Oxford University Press, New York, pp. 3 – 16.

Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G, 2009. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *PNAS* 106:17841-17846.

Thaiss CA, Levy M, Itav S, Elinav E. 2016. Integration of Innate Immune Signaling. *Trends in Immunology*. 37(2):84-101.

Ueti MW, Reagan JO Jr, Knowles DP Jr, Scoles GA, Shkap V, Palmer GH. 2007. Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*. 75(6):2959-64.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 40(15):e115.

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

Apêndice C

Caracterização funcional das vias de sinalização do sistema imune nas células embrionárias BME26 de *Rhipicephalus microplus*

Janaína Capelli-Peixoto¹, Rafael Diego da Rosa², Sandra Kalil Perdomo¹, Andréa

Cristina Fogaça¹, Sirlei Daffre^{1*}

¹Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, CEP 05508-900, São Paulo, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

* Autor correspondente: Telefone: +55 11 3091-7272 / Email: sidaffre@icb.usp.br

Resumo

O carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* causa perdas econômicas significativas para o setor pecuário brasileiro. Além disso, o carrapato atua como vetor da bactéria *Anaplasma marginale*, agente etiológico da anaplasmoose bovina. O conhecimento dos fatores que controlam a infecção por *A. marginale* no carrapato vetor é limitado. Recentemente, nosso grupo identificou, através de análises *in silico*, os componentes das vias de sinalização Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat. Além disso, mostrou que estes componentes são expressos constitutivamente nas células da linhagem BME26 (originária do carrapato *R. microplus*) e que são modulados diferencialmente frente a estímulos por diferentes microrganismos. Além dos componentes das vias de sinalização, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) também foram reprimidos em células BME26 infectadas por *A. marginale*, possivelmente porque a bactéria manipula o sistema imune do carrapato de modo a favorecer sua sobrevivência, propiciando a colonização bem-sucedida do vetor. Em uma caracterização funcional das vias de sinalização, carrapatos *R. microplus* machos, tiveram os fatores de transcrição Dorsal (via Toll), Relish (via Imd) e Stat (via Jak/Stat) silenciados através de RNA de interferência (RNAi) e foram infectados por *A. marginale*. Os resultados indicaram que o fator de transcrição Relish controla a infecção por *A. marginale* no intestino e nas glândulas salivares dos carrapatos, provavelmente via regulação do PAM microplusina. Ainda no sistema *in vivo*, a análise da expressão relativa dos fatores de transcrição revelou um silenciamento inespecífico ocasionado pelas duplas fitas de RNA (dsRNAs) para Dorsal e Stat. Dessa forma, as células BME26 foram utilizadas para investigar o silenciamento inespecífico dos fatores de transcrição detectado nos carrapatos. Para tanto, foram consideradas duas variáveis, sendo a primeira, o uso do grupo controle tratado com solução de suspensão das dsRNAs e de uma dsRNA não relacionada (dsGFP), e a segunda, o efeito *off-target*, comumente relatado na técnica de RNAi. Ambas as variáveis analisadas sugerem que não existe silenciamento inespecífico pelas dsRNAs dos fatores de transcrição. Assim, nossa hipótese é de que pode ocorrer um *cross-talking* entre as vias de sinalização. Entretanto, mais estudos devem ser realizados de modo a se comprovar esta hipótese. Além disso, nas células BME26, apesar dos fatores terem sido eficientemente silenciados, o número de bactérias *A. marginale* dos grupos tratados foi igual ao do grupo controle, diferente do observado nos carrapatos.

Palavras-chave: *Rhipicephalus microplus*, *Anaplasma marginale*, Toll, Imd, Jak/Stat, *cross-talk*.

Introdução

O carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) tem grande importância médico-veterinária no Brasil, causando significativas perdas econômicas para o setor pecuário decorrentes principalmente da espoliação sanguínea que ocasiona redução de peso do animal e queda na produção de leite (Grisi et al., 2014). Além disso, o *R. microplus* é vetor da bactéria *Anaplasma marginale*, agente etiológico da anaplasmose bovina (Kocan et al., 2010).

As estratégias empregadas para o controle do *R. microplus*, como o uso de acaricidas, estão se tornando cada vez mais ineficazes, devido à rápida seleção de populações resistentes (Klafke et al., 2013). Essa situação reforça a necessidade de entender a biologia da interação entre o hospedeiro, o vetor e o patógeno para gerar conhecimento que possa ser utilizado na identificação de novos alvos para o controle dos carrapatos e para o bloqueio da transmissão de patógenos.

O uso de linhagens celulares derivadas de carrapatos tem contribuído de maneira significativa para o conhecimento sobre a biologia dos parasitas a complexa interação vetor-patógeno (Bell-Sakyi et al., 2007). As linhagens celulares constituem sistemas homogêneos, sensíveis e reprodutíveis, permitindo a detecção de alterações sutis na resposta a diferentes estímulos (Barletta et al., 2012).

Um estudo com uma linhagem de células embrionárias do carrapato *R. microplus*, BME26, identificou transcritos envolvidos na resposta imune, tais como a ferritina, serino-proteases, inibidores de protease, proteínas de choque térmico, glutathiona S-transferase, peroxidase, NADPH-oxidase, além de peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Esteves et al., 2008). Analisando os efeitos da infecção por *A. marginale* sobre genes envolvidos no controle do estresse oxidativo, observou-se que os genes que codificam enzimas oxidantes (óxido nítrico sintase, oxidase do retículo endoplasmático e dual oxidase) foram reprimidos enquanto os genes codificadores de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona-S-transferase e tioredoxina) foram induzidos. Por outro lado, o perfil da modulação dos genes oxidantes e antioxidantes durante a infecção pela bactéria *Rickettsia rickettsii* (não transmitida por *R. microplus*), foi o contrário do observado com *A. marginale*, com genes oxidantes induzidos e antioxidantes reprimidos (Kalil-Perdomo et al., em preparação). A partir de

uma biblioteca subtrativa, determinou-se os genes diferencialmente expressos em células BME26 infectadas por *A. marginale*. Dentre esses genes, a glutatona S-transferase, sinaptobrevina, dineína, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato3fosfatase e COXIII, foram selecionados para estudos funcionais no carrapato *R. microplus*, através do silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi). Após a administração das dsRNAs para a COXIII, os carrapatos comprovadamente infectados por *A. marginale* não foram capazes de transmitir a bactéria para um bezerro não infectado (Bifano et al., 2014).

Assim como todos os organismos vivos, os carrapatos precisam se defender de infecções por patógenos. As defesas imunológicas evoluíram para distinguirem o próprio do não-próprio e para produzir moléculas efetoras que têm como alvo esses invasores. Similar a outros invertebrados, a resposta imune inata nos carrapatos é controlada pelas vias de sinalização Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat que são ativadas mediante o reconhecimento de moléculas associadas a patógenos e induzem a expressão de peptídeos antimicrobianos (PAMs) e outros fatores relacionados ao sistema imune que atuam no controle do patógeno (Sonenshine e Hynes, 2008; Kopacek et al., 2010; Hajdusek et al., 2013; Smith e Pal, 2014; Palmer e Jiggins, 2015).

Recentemente, nosso grupo identificou componentes das vias de sinalização celular Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat, através de análises *in silico* em bancos de dados de sequências nucleotídicas de carrapatos e avaliou a expressão gênica destes genes em células BME26 frente a diferentes estímulos microbianos. De maneira global, a infecção por *A. marginale* suprimiu a expressão dos genes dos componentes das vias, enquanto que as bactérias *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, *R. rickettsii* e o fungo *Saccharomyces cerevisiae* induziram a expressão gênica dos componentes das vias de sinalização (Rosa et al., 2016). Para a caracterização funcional das vias de sinalização, os fatores de transcrição Dorsal (via Toll), Relish (via Imd) e Stat (via Jak/Stat) foram silenciados por RNAi em carrapatos *R. microplus* machos. O fator de transcrição Relish está ligado ao controle de *A. marginale* no intestino e glândulas salivares dos carrapatos, muito provavelmente via indução do PAM microplusina. Além disso, o fator Stat parece regular a expressão dos PAMs ixodidina, defensina e lisozima. Curiosamente, nossos resultados mostraram que o silenciamento gênico dos fatores de transcrição das vias

Toll e Jak/Stat não foram específicos, uma vez que o tratamento com dsDorsal silenciou seu gene alvo (Dorsal), mas também Relish, assim como dsStat silenciou seu gene alvo (Stat) e também Relish. Apenas o tratamento com dsRelish silenciou especificamente o gene alvo, Relish (Capelli-Peixoto et al., em preparação). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a especificidade do silenciamento gênico dos fatores de transcrição Dorsal, Relish e Stat quando tratada com as dsRNAs alvos destes fatores, bem como avaliar o papel das vias Toll, Imd e Jak/Stat no controle da bactéria *A. marginale* pela linhagem celular BME26.

Material e Métodos

Células embrionárias BME26

A linhagem celular BME26 do carrapato *R. microplus* (Esteves et al., 2008) foi mantida em estufa BOD a 34°C na ausência de CO₂, em meio Leibovitz L-15 (Invitrogen) suplementado com 5% de soro fetal bovino termo-inativado (Vitrocell), 10% de caldo fosfato triptose e 0,1% de lipoproteína bovina (MP Biomedicals) e pH 7,2.

Anaplasma marginale

O inóculo de *Anaplasma marginale* cepa Jaboticabal (de Andrade et al., 2004) foi obtido a partir de sangue bovino infectado experimentalmente (com 10% de bacteremia) congelado em 10% de DMSO. Depois de descongelado em banho úmido a 37°C, o sangue foi centrifugado a 3000 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento contendo fragmentos celulares e *A. marginale* foi lavado duas vezes com PBS estéril por centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente e suspenso em 1 mL de PBS. Essa suspensão de *A. marginale* foi transferida para as garrafas de cultivo 12,5 cm² (Biofil) contendo 1,5x10⁶ células BME26. A MOI (*multiplicity of infection*) foi de 941:1 (microrganismos:célula) nos experimentos para a determinação da expressão de genes relacionados ao sistema imune por qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativo) em larga escala e de 497:1 para os experimentos de silenciamento gênico dos fatores de transcrição por RNA de interferência (RNAi). O controle negativo foi sangue bovino livre de patógenos e processado da mesma forma que o sangue contendo *A. marginale*.

Infecção das células BME26 com *A. marginale*

Uma monocamada com $1,5 \times 10^6$ células BME26 cultivadas em garrafas de 12,5 cm² foi incubada a 34°C em meio sem antibiótico. Após 24 horas, o meio de cultivo foi descartado e substituído por meio de cultura com o inóculo descrito no item anterior. Transcorrido o tempo de incubação de 7 dias com as bactérias, o sobrenadante foi descartado e a monocamada celular foi lavada com PBS 1x e descolada com Tripsina/EDTA (5mg/mL) (Vitrocell Embriolife). As células em suspensão foram centrifugadas a 3.000 x g, durante 10 min a 4°C e o sedimento foi usado para a extração de DNA e RNA.

Extração de DNA, RNA e síntese de cDNA

Para a extração de DNA genômico (DNAg), utilizou-se o kit *Smarter Nucleic Acid Sample Preparation* (Stratagene molecular), de acordo com as instruções do fabricante. A extração de RNA foi realizada com TRIzol® *Reagent* (Invitrogen), também de acordo com as orientações do fabricante. O RNA obtido foi tratado com DNase (Invitrogen) e a síntese do cDNA foi efetuada utilizando a enzima SuperScriptIII™ (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. O material foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão apresentados na tabela 1. Os oligonucleotídeos utilizados para a síntese das dsRNA foram acrescidos da sequência promotora T7, como sugere o kit T7 Ribomax™ Express RNAi System (Promega).

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para os ensaios de RT-qPCR, qPCR e síntese das dsRNA. A sequência T7 (dsRNA) está sublinhada.

Gene	Nº de acesso	Primer Senso	Primer Anti-senso
40S ribosomal protein S3a	GenBank/CV443892	GGACGACCGATGGCTACCT	TGAGTTGATTGGCGCACTTCT
Malate dehydrogenase	GenBank/CV455409	AAACTGTCCCAGTACGAGTC	TCTTGACGAAGTCCTCTCC
Glutamate dehydrogenase	GenBank/CK185727	GCCAGACAAATCATGCGTAC	AGCTAAGTGAAGGTGAGACC
Cytochrome c oxidoreductase	GenBank/CK173844	GGGAAGCTTCTGTTGACATG	ATCAACCACTCTGGGTTCTG
Microplusina	GenBank/AY233212	CAGTGAAGCCTTCGCATCAG	CCGAAGTCGAAGCCACAAG
Hebraína	GenBank/AAR97292.1	TGAAGCTGCCATGGCGAACC	TGGTGGTGTGGTGGTGACC
Defensina	GenBank/AY233213	GATGCCCGTTTAACCAAGGA	TTGATTAGGCCAGCGCAGTA
Scasina		TCGACATAGGTCTTGGATGC	GTACAGACGATGTTGAACGG
Ixodidina	GenBank/P83516.2	CAAAATGCAGTCCCGTTACGT	CCACGACGGCAGAAGCATCC
Lisozima		AAACGACGACATCACTGACG	TGTAGTTGACTCCTCTGCAG
Dorsal dsRNA Dorsal	GenBank/KF828755	CATATCGGGTACATCCACAC	GGCTTGTAAGGTGCATGTC
		<u>TAATACGACTCACTATAGGCTT</u> GTTGGCAAGGAAGGCTG	<u>TAATACGACTCACTATAGGCGC</u> TCCTCCTCAAACCACAC
dsRNA Dorsal2		<u>TAATACGACTCACTATAGGGCT</u> TCCAAGTGTTCTCGAA	<u>TAATACGACTCACTATAGGCAT</u> CTCGCTCCTCCTCAAAC
Relish	GenBank/KF828760	GCACGACAGCCAATTATTCG	CTCTTGCTCAGCAGAAGAAG
dsRNA Relish		<u>TAATACGACTCACTATAGGCTT</u> CTTCTTCTGCTGAGC	<u>TAATACGACTCACTATAGGAGA</u> CGATAGACATGCTGG
dsRNA Relish2		<u>TAATACGACTCACTATAGGGCA</u> AATCGCAAGTCAGGATC	<u>TAATACGACTCACTATAGGTCC</u> GACTTGCGAATCAGCTG
Stat	GenBank/KF828772	TAGTGTTCCAGGTTTGGACG	CCGTCGCAGACTTAACTTC
dsRNA Stat		<u>TAATACGACTCACTATAGGCAC</u> AGTAACCTGGGACAATG	<u>TAATACGACTCACTATAGGCGC</u> GGGTGACTTTCATGATG
dsRNA Stat2		<u>TAATACGACTCACTATAGGGTG</u> TCAGCTTTAGGAACATG	<u>TAATACGACTCACTATAGGTGG</u> TGCCAGGGAACCTTGTC
MSP5	GenBank/KP347554	CTTCCGAAGTTGTAAGTGAGG GCA	CTTATCGGCATGGTCGCCTAG TTT
MSP5 – probe		(56-FAM/GCCTCCGCGTCTTTCAACAATTTGGT/3BHQ_1).	
dsRNA GFP		GenBank/ABE28520.1	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGC</u> GACGTAAACGGCCACAAGTT

Quantificação da infecção por *Anaplasma marginale*

A quantificação do número total de bactérias *A. marginale* foi determinada por qPCR, através da amplificação de um fragmento do gene de cópia única *msp5* de *A. marginale* (Bifano et al., 2014), utilizando-se do DNAg extraído das células BME26 infectadas como molde. As reações foram realizadas num volume final de 15 µL na presença de 7,5 µL do TaqMan® 2x PCR Master Mix (Thermo Scientific), 1,2 µL da mistura de cada par de oligonucleotídeos (senso e antisenso) (0,4 µM), 2 µL de DNAg (aproximadamente 100 ng), 0,02 µL da sonda específica para cada bactéria (Tabela 1) e 3,48 µL de H₂O livre de nucleases. O programa térmico utilizado foi de 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, realizado em um termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems). Para a determinação do número total de bactérias, uma curva padrão foi construída com diluições seriadas na base 10 de DNA plasmidial contendo o fragmento do gene *msp5* em concentrações conhecidas. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Análise da expressão gênica por qPCR

A qPCR em larga escala foi realizada em placas no formato 96x96 (Fluidigm Corporation) na plataforma Fluidigm (Fluidigm® BioMark System), conforme descrito por Rosa et al., (2012). Os dados de Ct (*threshold cycle*) obtidos foram normalizados de acordo com a média aritmética de Ct de quatro genes de referência (Malato desidrogenase, Glutamato desidrogenase, Citocromo c oxireductase e proteína ribossomal S3a) (Tabela 1). Os níveis de expressão foram calculados através método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), utilizando as células tratadas com sangue livre de patógenos como condição calibradora.

Alternativamente, as análises por qPCR reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), no programa térmico de uma pré-incubação de 95°C por 10 minutos, seguida pela amplificação do DNA alvo em 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e hibridização/extensão a 60°C por 1 minuto. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems) em um volume final de 15 µL, contendo 7,5 µL do *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X* (Thermo Scientific), 1,2 µL da mistura de cada par de

oligonucleotídeos (0,4 μ M), cDNA (aproximadamente de 50ng) e qsp. 15 μ L de H₂O livre de nucleases. As amplificações pelo PCR e as análises. A curva de dissociação foi realizada imediatamente após a amplificação do DNA alvo com uma taxa de transição de temperatura linear de 0,3°C de 60°C a 95°C com determinação contínua da aquisição da fluorescência. Os níveis de expressão dos genes foram normalizados de acordo com os níveis de expressão do gene de referência da proteína ribossomal S3A (Fogaça et al., 2004) e a relação entre a expressão do gene de interesse nas células tratadas e no controle foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Silenciamento gênico

As células BME26 ($1,5 \times 10^6$) foram aderidas em garrafas de cultivo e incubadas a 34°C. Após 24h foram adicionadas ao meio de cultivo 1×10^{13} moléculas de dsRNA dos fatores de transcrição Dorsal (via Toll), Relish (via Imd) e Stat (via Jak/Stat) suspensas em tampão de dsRNA (0,1 mM EDTA, pH 8,0 Invitrogen). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados estão descritas na tabela 1.

Foram utilizadas entre 5 a 10 réplicas biológicas para cada condição e o tempo de incubação com as dsRNA foi de 7 dias. Como controle para os experimentos de silenciamento gênico foi utilizado tampão de suspensão de dsRNA, a mesma utilizada para suspender as dsRNA, como descrito em Bifano e col. (2014), ou dsGFP, como gene não relacionado ao patossistema carrapato-*Anaplasma*.

O mesmo protocolo de silenciamento gênico foi utilizado no experimento de infecção, onde as células BME26 aderidas foram incubadas com as moléculas de dsRNA e incubadas por 24h. Após este período, as células foram infectadas por *A. marginale* conforme o item "*Anaplasma marginale*" do Material e Métodos. Após 7 dias de infecção, o DNA e RNA foram extraídos, conforme o item "Extração de DNA, RNA e síntese de cDNA".

Análise estatística

Para avaliar a significância estatística das diferenças observadas entre os grupos experimentais e os controles foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Uma vez identificada diferença entre os grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney com correção de

Bonferroni. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As representações gráficas foram feitas pelo software *GraphPad Prism versão 5* (GraphPad Software).

Resultados

A expressão gênica dos PAMs foi reprimida frente à infecção por *A. marginale*

A progressão da infecção de *A. marginale* nas células BME26 foi monitorada por 6, 24 e 72 horas pós-infecção, pela quantificação absoluta do número de bactérias por qPCR. O número de bactérias se manteve constante (aproximadamente $5,4 \times 10^7$ bactérias/garrafa) (Figura 1A) e a taxa de mortalidade das células foi menor que 10% (dados não mostrados).

O perfil transcricional de seis genes do carrapato *R. microplus* que codificam os PAMs microplusina, hebraína, defensina, scasina, ixodidina e lisozima foram analisados em células BME26 em 6, 24 e 72 h após a infecção com *A. marginale*, através de RT-qPCR em larga escala. Os dados de expressão relativa gerados foram analisados em um gráfico do tipo *heat-map* (Figura 1B). De maneira global, a maioria das expressões gênicas avaliadas passaram de uma condição não-modulada em 6 horas para uma condição reprimida após 24 e 72 horas de infecção (Figura 1B).

Silenciamento dos fatores de transcrição em células BME26 infectadas por *Anaplasma marginale*

Os experimentos realizados com o carrapato *R. microplus* mostraram que o número de bactérias aumentou significativamente no intestino e nas glândulas salivares quando Relish foi silenciado, sugerindo que o fator de transcrição Relish (via Imd) tem um importante papel no controle da infecção por *A. marginale*. No entanto, os resultados da expressão gênica após o tratamento com as dsDorsal, dsRelish e dsStat mostraram que somente a dsRelish silenciou especificamente seu gene alvo. Já as dsDorsal e dsStat silenciaram tanto seu gene alvo, como também Relish (Capelli-Peixoto et al., em preparação).

Com base nos resultados observados no modelo *in vivo*, buscamos avaliar se a não-especificidade de silenciamento também ocorria no modelo *in vitro*, utilizando para isso a linhagem celular BME26.

As análises da expressão gênica dos três fatores de transcrição após o tratamento com as dsRNAs para Dorsal, Relish e Stat nas células BME26 mostraram que a dsDorsal não silenciou significativamente nenhum dos fatores, apesar de ser observada uma redução não significativa de 28,7% na expressão do seu gene alvo Dorsal (Figura 2A). Além disso, as dsRelish e dsStat silenciaram significativamente seus genes alvo, mas também os outros fatores de transcrição (Figura 2A). No grupo tratado com dsRelish foi observado silenciamento gênico de 70% para Dorsal, 58% para Relish e 45% para Stat e no grupo tratado com dsStat, os valores de silenciamento foram de 61% para Dorsal e 46% para Stat (Figura 2B). As dsRNA Dorsal, Relish e Stat utilizadas nos experimentos com as células BME26 foram as mesmas utilizadas para o silenciamento gênico nos carrapatos (Capelli-Peixoto et al., em preparação). Portanto, assim como observado nos diferentes tecidos do carrapato, a inespecificidade do silenciamento gênico dos fatores de transcrição também foi observada nas células BME26. O número de bactérias das células tratadas com as dsRNAs dos fatores de transcrição foi avaliado (Figura 3). Apesar de constatado o silenciamento dos três fatores no grupo tratado com dsRelish e de Dorsal e Stat no grupo tratado com dsStat (Figura 2A e B), o número de bactérias dos grupos tratados com dsRNAs foi igual ao do grupo controle (Figura 3). Portanto, diferentemente dos resultados encontrados nos experimentos com carrapatos, os experimentos com as células BME26 sugerem que as vias de sinalização Toll, Imd e Jak/Stat não foram capazes de controlar a infecção.

Silenciamento dos fatores de transcrição não é específico

Conforme apresentado acima, o silenciamento gênico não-específico dos fatores de transcrição Dorsal, Relish e Stat observado nos intestinos e glândulas salivares do carrapato *R. microplus* (Capelli-Peixoto et al., em preparação) também foi observado no modelo celular BME26. Tanto nos experimentos com carrapatos quanto nos experimentos com células BME26 foram utilizados como controle de silenciamento a solução utilizada para suspender as dsRNA (0,1mM EDTA).

Para tentar entender o silenciamento não-específico dos fatores de transcrição, a primeira variável analisada foi justamente o grupo controle. Assim, realizamos um experimento no qual as células foram tratadas com a solução de suspensão das dsRNA (0,1mM EDTA) dsRNA para um gene não relacionado ao patossistema *R. microplus* – *A. marginale* (dsGPF). A expressão relativa dos fatores de transcrição Dorsal (Figura 4A), Relish (Figura 4B) e Stat (Figura 4C) nos dois grupos foi avaliada. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística nos grupos de células BME26 tratadas com a solução de suspensão das dsRNA ou com dsGFP (Figura 4A - C), demonstrando que o silenciamento não-específico dos fatores de transcrição observados nos experimentos *in vivo* e *in vitro* não é devido ao controle utilizado.

Outra variável analisada foi o uso de dsRNAs para posições diferentes das sequências de nucleotídeos dos genes Dorsal, Relish e Stat (chamados de dsRNA2). Em células tratadas com dsDorsal2, a expressão relativa de nenhum fator de transcrição foi diferente do controle (Figura 5A). Apesar de não ter diferença estatística, detectou-se um percentual de silenciamento de 38,3% para Dorsal, semelhante ao obtido com dsDorsal (Figura 2). O grupo de células tratadas com dsRelish2 teve a expressão relativa dos fatores de transcrição Dorsal e Relish diminuídos (Figuras 5B), com um percentual de silenciamento de 35% e 41% (Figura 5C). A eficiência de silenciamento da dsStat2 não foi satisfatória, uma vez que não houve silenciamento do seu gene alvo (dado não mostrado).

Discussão

Na linhagem celular BME26, a presença da bactéria *A. marginale* reprimiu a expressão dos genes de diversos componentes das vias de sinalização Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat em tempo iniciais da infecção (de 6 a 72 horas) (Rosa et al., 2016). A bactéria também ocasionou uma redução na expressão relativa dos PAMs microplusina, hebraína, defensina, scasina, ixodidina e lisozima (Figura 1B). Os PAMs são importantes efetores das vias de sinalização que agem contra o patógeno invasor para controlar o número de microrganismos. A diminuição dos níveis de transcritos dos componentes das vias de sinalização Toll, Imd, Jnk e Jak/Stat e dos PAMs pode representar uma tentativa de *A. marginale* de manipular o sistema imune do carrapato para sobreviver e colonizar

o vetor (Rosa et al., 2016). No intestino e glândulas salivares de carrapatos *R. microplus* machos infectados com *A. marginale*, a expressão gênica da microplusina foi induzida 12 dias pós-infecção. Ainda no intestino, a expressão relativa da defensina e lisozima foram reprimidas (Capelli-Peixoto et al., em preparação). Entretanto, outros experimentos *in vivo* devem ser realizados para que possamos avaliar a modulação gênica dos PAMs frente à infecção bacteriana em tempos iniciais de infecção.

Os resultados da expressão gênica dos fatores de transcrição Dorsal, Relish e Stat nos experimentos *in vivo* mostraram que somente a dsRelish silenciou especificamente seu gene alvo, diferente dos resultados obtidos com dsDorsal e dsStat (Capelli-Peixoto et al., em preparação). Por causa deste fenótipo observado nos carrapatos, nós avaliamos o silenciamento dos fatores de transcrição Dorsal, Relish e Stat no modelo celular BME26, para, primeiramente, avaliar se a não-especificidade de silenciamento também ocorria nas células.

Após o tratamento das células BME26 com as dsRNA dos três fatores de transcrição, a expressão relativa dos fatores de transcrição e o percentual de silenciamento de cada gene foram avaliados (Figura 2A e B). Os resultados mostram que o grupo tratado com dsRelish teve a expressão relativa de Dorsal, Relish e Stat reprimidas e o grupo tratado com dsStat teve a expressão relativa de Dorsal e Stat diminuídas. Quando as células foram tratadas com a dsDorsal, a expressão relativa dos três fatores de transcrição não foi diferente do grupo controle (Figura 2A).

Também utilizamos o modelo *in vitro* para determinar a causa da não-especificidade de silenciamento. Para tal, analisamos duas variáveis: 1) a utilização de dois controles nos experimentos de RNAi (tampão de suspensão e dsRNA não relacionada ao patossistema) e 2) utilização de duas diferentes dsRNA para o mesmo gene. Nos experimentos *in vivo* quanto *in vitro*, o grupo controle foi injetado/tratado com a solução de suspensão das dsRNA (0,1mM EDTA). O uso da solução de solubilização de dsRNA como controle é amplamente empregada na literatura, incluindo no modelo *R. microplus* (Kocan et al., 2008, Hynes et al., 2008, Liu et al., 2012, Bifano et al., 2014 e Hussein et al., 2015). No entanto, diversos outros grupos de pesquisa preferem utilizar uma dsRNA não relacionada, como a dsGFP por exemplo, para garantir que no grupo controle, a maquinaria de dsRNA também será ativada (Garver et al., 2009, Han-Ching

Wang et al., 2010 e Narasimhan et al., 2014). Os resultados obtidos pelo tratamento de células BME26 com a solução de suspensão das dsRNA ou com a dsGFP, mostraram que a expressão relativa de Dorsal, Relish e Stat nos dois grupos não apresentou diferença significativa (Figura 4A – C).

Uma hipótese para explicar o silenciamento não-específico dos fatores de transcrição seria o efeito *off-target*, ou seja, uma resposta inespecífica de siRNAs (*small interfering RNA*) que reconhecem e interferem na expressão de mRNAs aleatórios que apresentam similaridade parcial com o mRNA-alvo (Franca et al., 2010). Cabe salientar que não foi detectada similaridade significativa após o alinhamento dos genes Dorsal, Relish e Stat por Blast (dados não mostrados). O tratamento com dsDorsal2 (Figura 5A) apresentou o mesmo fenótipo obtido com dsDorsal (Figura 2), ou seja, nenhum fator de transcrição foi silenciado, com exceção do gene alvo Dorsal. Em ambos os tratamentos com as diferentes dsRNA, observou-se um baixo percentual de silenciamento. Para dsRelish2, o fenótipo observado foi diferente ao obtido com o tratamento com a dsRelish, somente no silenciamento de Stat, que não foi silenciado no grupo tratado com a nova dsRelish2, mas foi 45% silenciado com o uso da dsRelish. A expressão relativa de Dorsal e Relish foram diminuídas com o tratamento pela dsRelish2. O silenciamento promovido por dsRelish e dsRelish2, mostrou que dois oligonucleotídeos distintos para o mesmo gene tiveram uma resposta semelhante de silenciamento (Figuras 2A e 5B). Como o tratamento com dsStat2 não foi satisfatório, uma nova dsRNA (dsRNA 3) deve ser testada.

O que chama atenção é que apesar dos três fatores terem sido silenciados no grupo tratado com dsRelish (70% de Dorsal, 58% de Relish e 45% de Stat) (Figura 2), o número de bactérias deste grupo foi igual ao do grupo controle (Figura 3). Esse resultado é diferente dos obtidos em carrapatos, nos quais somente Relish (silenciamento específico) conseguiu controlar a infecção por *A. marginale* (Capelli-Peixoto et al., em preparação).

As células BME26 tem algumas características que merecem ser destacadas: a linhagem embrionária apresenta no mínimo duas subpopulações bem definidas, com células de tamanho e granulidade diferentes que não sobrevivem na ausência de uma delas. Entretanto, ainda não é sabido se somente uma (ou ambas) subpopulação é

infectada por *A. marginale*. De qualquer maneira, após 7 dias de infecção a porcentagem de células infectadas é de aproximadamente 10% (dados não mostrados). A infecção por *A. marginale* não gera prejuízos para a duplicação das células BME26, uma vez que a taxa de crescimento das células infectadas é similar ao das células sem infecção, além do que as taxas de mortalidade celular também são baixas (dados não mostrados). Vale ressaltar que a bactéria *A. marginale* não é transmitida transovarianamente para a prole de *R. microplus* (Esteves et al., 2015). Assim, linhagens de células embrionárias talvez não correspondam ao ambiente ideal para o crescimento da bactéria. Além disso, as células da linhagem BME26 fazem fagocitose, expressam PAMs e outros componentes do sistema imune (Esteves et al., 2008) e são capazes de controlar a infecção por *A. marginale*.

Outra hipótese para tentar explicar o silenciamento não-específico dos fatores de transcrição é a do *crosstalk* ou ativação cruzada das vias de sinalização. Em *Drosophila*, ocorre *crosstalk* entre as vias Imd e Toll, uma vez que a proteína adaptadora Fadd, que atua entre Imd e Dredd na via Imd, pode interagir com Myd88, da via Toll (Horng e Medzhitov, 2001). Ou seja, o mesmo componente pode participar das vias Imd e Toll. Em células de mamíferos, também já foram relatados diversos tipos de *crosstalk* (Thaiss et al., 2016). O *crosstalk* entre as vias permite uma amplificação do sinal com baixo custo energético, além da integração de vários estímulos, como a produção de diferentes PAMs. Entretanto, com o conjunto de resultados que nós temos até o momento, não conseguimos afirmar que as vias de sinalização de *R. microplus* podem ser interligadas. Para comprovar esta hipótese, os inibidores, componentes *upstream* das vias e efetores sabidamente específicos para cada via de sinalização podem ser silenciados e o fenótipo avaliado. No entanto, o silenciamento inespecífico dos fatores de transcrição é um grande limitante para novos experimentos funcionais, uma vez que não nos permite correlacionar as vias de sinalização com a produção de efetores específicos de cada via.

Conclusão

O sistema imune inato de carrapatos é complexo, incluindo várias vias sinalizadoras coordenadas e sincronizadas para assegurar a homeostasia e controlar infecção microbianas. Nossos dados mostraram que as vias de sinalização Toll, Imd e

Jak/Stat parecem não controlar a infecção pela *A. marginale* na linhagem celular BME26, uma vez que o número de bactérias dos grupos de células BME26 com os fatores de transcrição silenciados foi igual ao grupo controle. Este resultado é diferente do obtido no modelo *in vivo*, no qual o fator de transcrição Relish parece ser responsável pelo controle da infecção. No entanto, foi observado que no modelo *in vitro* também ocorre o silenciamento não-específico dos fatores de transcrição, assim como no modelo *in vivo*. É a primeira vez que o silenciamento não-específico de vias de sinalização imune é relatado. Como os resultados obtidos com diferentes dsRNAs foram similares, é bem pouco provável que a não especificidade seja decorrente de efeito *off-target*. Os dados apresentados abrem perspectivas para estudos que busquem analisar a provável existência de *crosstalk* entre as vias de sinalização.

Figuras:

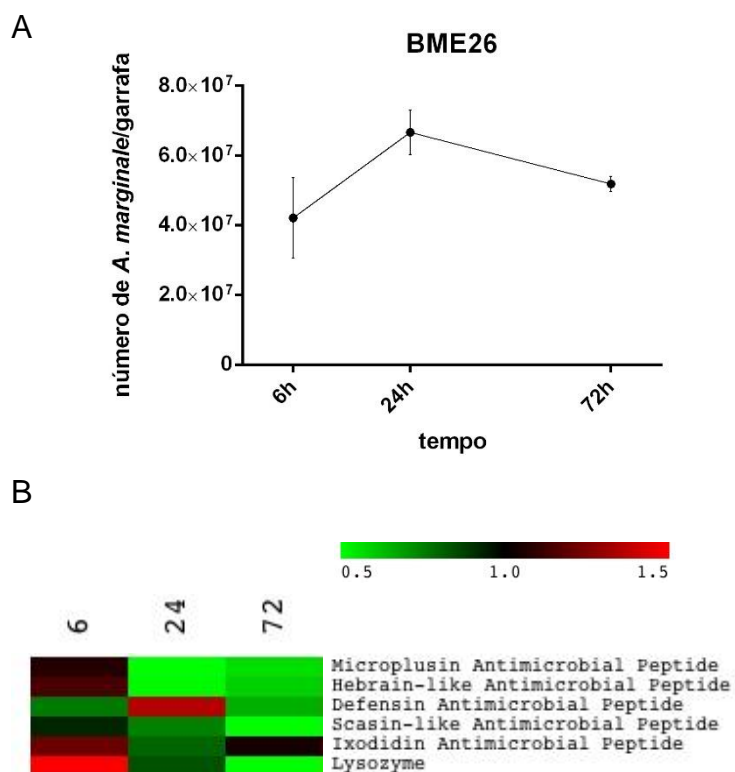
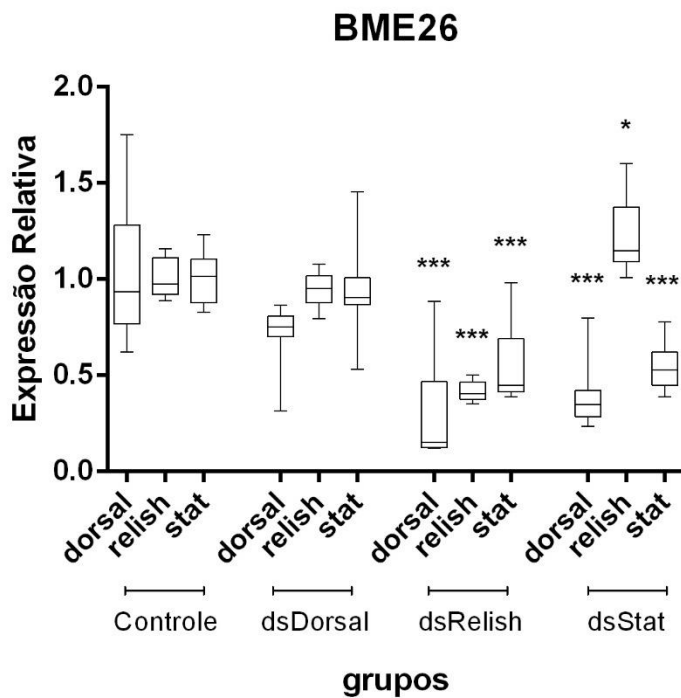


Figura 1. Curva de crescimento de *Anaplasma marginale* infectando células BME26 e expressão dos genes codificadores de peptídeos antimicrobianos. O DNAg extraído de células BME26 infectadas com *A. marginale* por 6, 24 e 72 horas foi utilizado como molde para a amplificação de um fragmento do gene de cópia única *msp5* por qPCR (A). O perfil de expressão gênica dos peptídeos antimicrobianos 6, 24 e 48h após o desafio bacteriano foi determinado por RT-qPCR em larga escala (B). A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak e Schmittgen, 2001). A análise da expressão gênica dos peptídeos nas células BME26 infectadas foi realizada considerando como condição calibradora a expressão em células BME26 incubadas com eritrócitos bovinos livres de infecção (controle). Cada amostra corresponde à média da triplicata biológica.

A



B

	dsDorsal	dsRelish	dsStat
Dorsal	n.m	70%±29	60,8%±17,3
Relish	n.m	58%±5	↑ 20%±19
Stat	n.m	44,5%±19,7	38,5%±26,3

Figura 2. Expressão relativa (A) e percentual de silenciamento (B) dos genes dos fatores de transcrição Dorsal, Relish e Stat nas células BME26 tratadas com dsDorsal, dsRelish e dsStat e posteriormente infectadas com *A. marginale*. O gráfico representa a mediana de 10 réplicas biológicas. Os testes estatísticos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados. Valores de p: * p<0.05 e *** p<0.001. n.m: expressão não modulada, ↑ : aumento na expressão relativa

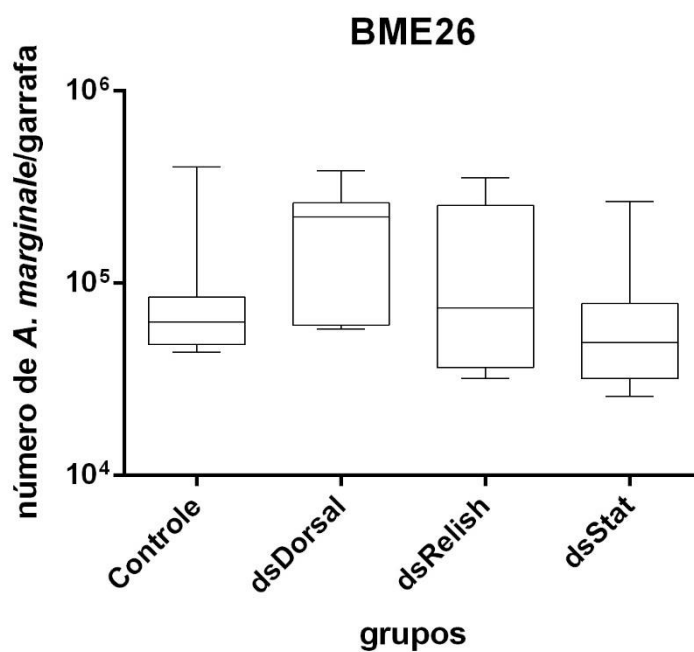


Figura 3. Número de bactérias *Anaplasma marginale* em células BME26 tratadas com dsDorsal, dsRelish e dsStat. O número de *A. marginale* foi determinado por qPCR utilizando a sonda TaqMan para o gene específico de copia única *msp5*. Os gráficos representam a mediana de 10 réplicas biológicas. O teste estatístico Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para verificar as diferenças significativas.

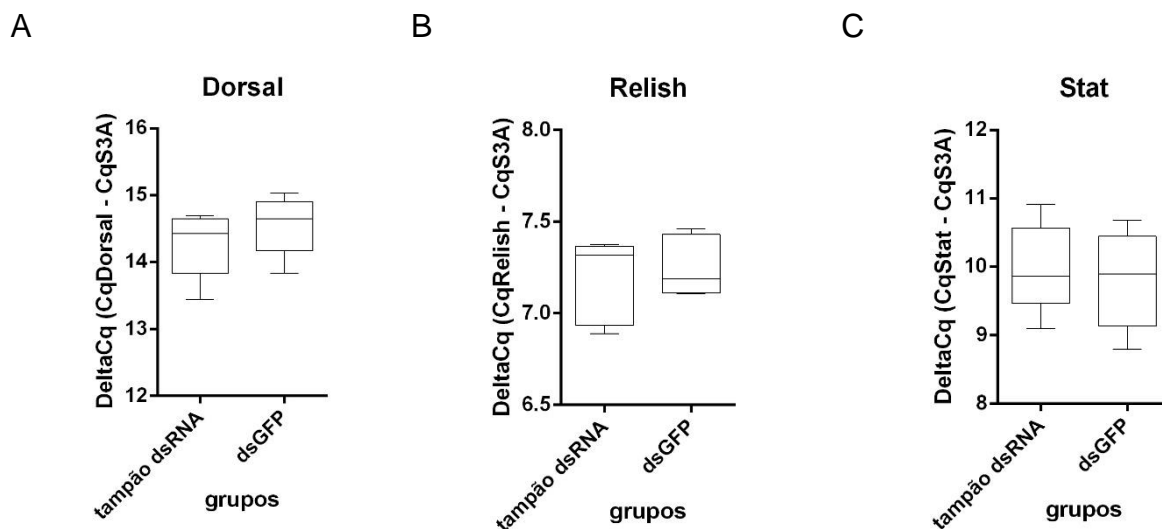


Figura 4. Valores de Delta Ct dos fatores de transcrição Dorsal, Relish e Stat nas células BME26 não infectadas e tratadas com a solução de suspensão das dsRNA (0,1mM EDTA) e com dsRNA para um gene não relacionado ao patossistema *R. microplus*-*A. marginale* (dsGPF), determinados pela subtração do Ct do gene alvo pelo Ct do gene de referência (S3a ribossomal). Os gráficos representam a mediana de 5 réplicas biológicas. O teste estatístico de Mann-Whitney foi utilizado para verificar as diferenças significativas.

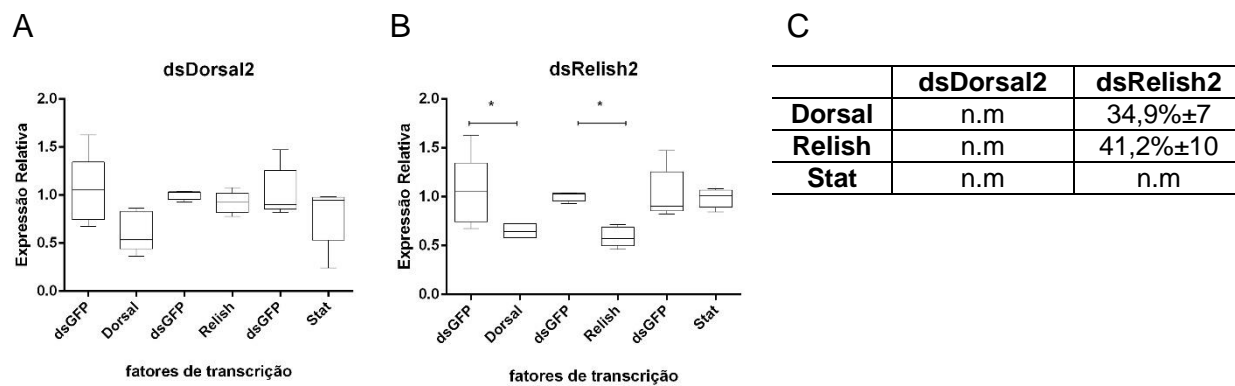


Figura 5. Expressão relativa (A e B) e percentual de silenciamento (C) dos fatores de transcrição Dorsal, Relish e Stat nas células BME26 não infectadas e tratadas com novos pares de oligonucleotídeos para dsRNA Dorsal2 (A) e dsRNA Relish2 (B), frente ao grupo controle dsGFP e determinada por RT-qPCR. Os gráficos representam a mediana de 5 réplicas biológicas. Os testes estatísticos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados. Valores de p: * $p < 0.05$. n.m: expressão não modulada.

Referências

- Barletta AB, Silva MC, Sorgine MH. 2012. Validation of *Aedes aegypti* Aag-2 cells as a model for insect immune studies. *Parasites & Vectors*. 5:148.
- Bell-Sakyi L, Zweggarth E, Blouin E, Gould E, Jongejan F. 2007. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends in Parasitology*. 23(9):450-57.
- Bifano T, Ueti M, Esteves E, Reif K, Braz G, Scoles G, Bastos R, White S, Daffre S. 2014. Knockdown of the *Rhipicephalus microplus* cytochrome c oxidase subunit III gene is associated with a failure of *Anaplasma marginale* transmission. *PLoS ONE*. 9(5):1-10.
- de Andrade G, Machado R, Vidotto M, Vidotto O. 2004. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1026(1):257-66.
- Esteves E, Lara FA, Lorenzini DM, Costa GH, Fukuzawa AH, Pressinotti LN, Silva JR, Ferro JA, Kurtti TJ, Munderloh UG, Daffre S. 2008. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38(5):568-80.
- Esteves E, Pohl P, Klafke G, Reck J, Fogaça A, Martins J, Daffre S. 2015. Low temperature affects cattle tick reproduction but does not lead to transovarial transmission of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*. 214(3-4):322-26.
- Fogaça AC, Lorenzini DM, Kaku LM, Esteves E, Bulet P, Daffre S. 2004. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental & Comparative Immunology*. 28:191-200.
- Franca NR, Mesquita Júnior D, Lima AB, Pucci FVC, Andrade LEC, Silva NP. 2010. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 50(6):695-709.
- Garver LS, Dong Y, Dimopoulos G. 2009. Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. *PLoS Pathogens*. 5(3):e1000335.
- Grisi L, Leite R, Martins J, Barros A, Andreotti R, Cançado P, Villela H. 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 23(2):150-56.
- Hajdusek O, Síma R, Ayllón N, Jalovecká M, Perner J, de la Fuente J, Kopacek P. 2013. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3(6):1-15.

Han-Ching Wang K, Tseng CW, Lin HY, Chen IT, Chen YH, Chen YM, Chen TY, Yang HL. 2010. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. *Developmental & Comparative Immunology*. 34(1):49-58.

Hornig T, Medzhitov R. 2001. Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *PNAS*. 98(22):12654-58.

Hussein HE, Scoles GA, Ueti MW, Suarez CE, Adham FK, Guerrero FD, Bastos RG. 2015. Targeted silencing of the Aquaporin 2 gene of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* reduces tick fitness. *Parasites & Vectors*. 8:618.

Hynes WL, Stokes MM, Hensley SM, Todd SM, Sonenshine DE. 2008. Using RNA interference to determine the role of varisin in the innate immune system of the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*. 46(1-4):7-15.

Klafke GMT, Reck J, Martins, JRS. La multiresistencia a los acaricidas y el control integral de garrapatas en Brasil. in III Simposio Internacional de Resistencia a los pesticidas en artrópodos: "El control integral de garrapatas y moscas del ganado y la mitigación de la resistencia a los pesticidas". 2013. Universidad Autónoma de Guerrero, Ixtapa, Zihuatanejo, México.

Kocan KM, de la Fuente J, Manzano-Roman R, Naranjo V, Hynes WL, Sonenshine DE. 2008. Silencing expression of the defensin, varisin, in male *Dermacentor variabilis* by RNA interference results in reduced *Anaplasma marginale* infections. *Experimental and Applied Acarology*. 46(1-4):17-28.

Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*. 167(2-4):95-107.

Kopacek P, Hajdusek O, Buresová V, Daffre S. 2010. Tick Innate Immunity. In K. Soderhall Ed., *Invertebrate Immunity*. p1–26.

Liu L, Daí J, Zhao YO, Narasimhan S, Yang Y, Zhang L, Fikrig E. 2012. *Ixodes scapularis* JAK-STAT pathway regulates tick antimicrobial peptides, thereby controlling the agent of human granulocytic anaplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 206(8):1233-41.

Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4): 402–8.

Narasimhan S, Rajeevan N, Liu L, Zhao YO, Heisig J, Pan J, Eppler-Epstein R, Deponte K, Fish D, Fikrig E. 2014. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the lyme disease spirochete. *Cell host & microbe*. 15:58-71.

Palmer WJ, Jiggins FM. 2015. Comparative Genomics Reveals the Origins and Diversity of Arthropod Immune Systems. *Molecular Biology and Evolution*. 32(8):2111-29.

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

Rosa R, Capelli-Peixoto J, Mesquita R, Kalil S, Pohl P, Braz G, Fogaça A, Daffre S. 2016. Exploring the immune signalling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: From molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. *Developmental & Comparative Immunology*. 59:1-14.

Smith A, Pal U. 2014. Immunity-related genes in *Ixodes scapularis* - perspectives from genome information. *Frontiers in cellular and infection Microbiology*. 4:116.

Sonenshine DE, Hynes WL. 2008. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Frontiers in Bioscience*. 13:7046-63.

Thaiss CA, Levy M, Itav S, Elinav E. 2016. Integration of Innate Immune Signaling. *Trends in Immunology*. 37(2):84-101.