

**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

## 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.

## 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*.



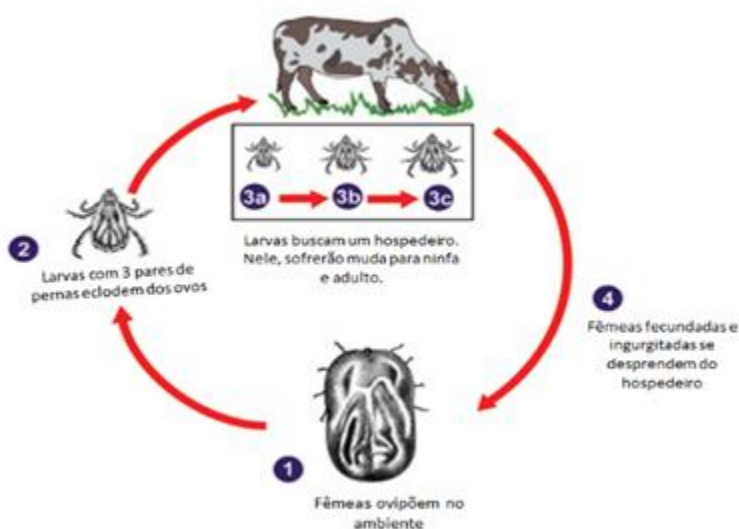
Do sul e sudeste asiático, o carrapato bovino *R. microplus* foi transportado com o gado para a África Oriental, para as Ilhas Comoro, Madagascar e Ilhas Mascarenhas, para a América Latina, para o norte e leste da Austrália, Nova Caledônia e Polinésia Francesa. Fonte: Barré e Uilenberg (2010).

### 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 acaricidas, 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<sup>PLUS</sup>, desenvolvida na Austrália e a Gavac<sup>TM</sup>, desenvolvida em Cuba (DE LA FUENTE et al., 1999). Em um experimento realizado em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, o uso da TickGard<sup>PLUS</sup> e Gavac<sup>TM</sup> 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).

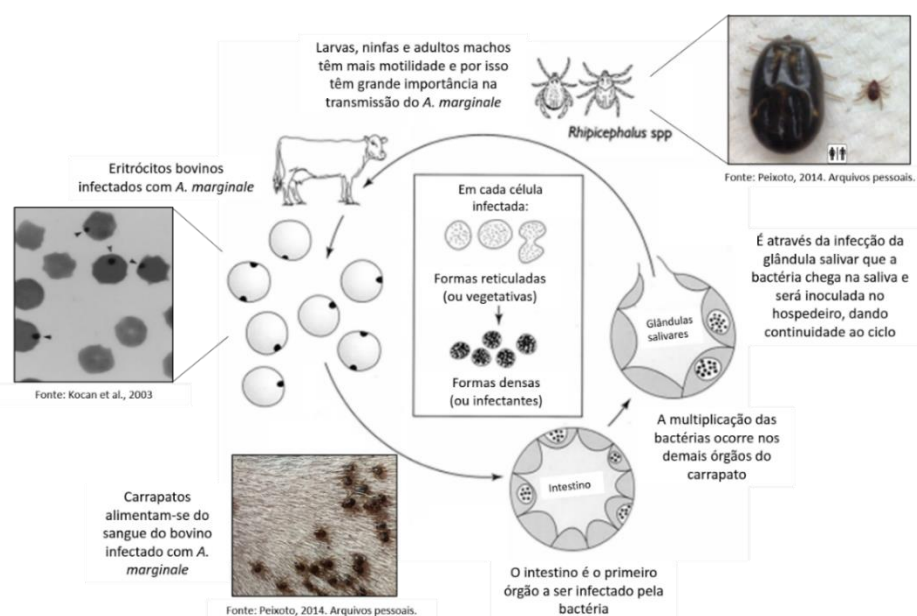
A bactéria *A. marginale* está amplamente distribuída nas regiões subtropicais e tropicais do globo terrestre, nas Américas, sul da Europa, Ásia, África e Austrália. Dezenove espécies de carrapatos já foram incriminadas como vetores biológicos de *A. marginale*, incluindo *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus* 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, ocorre 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

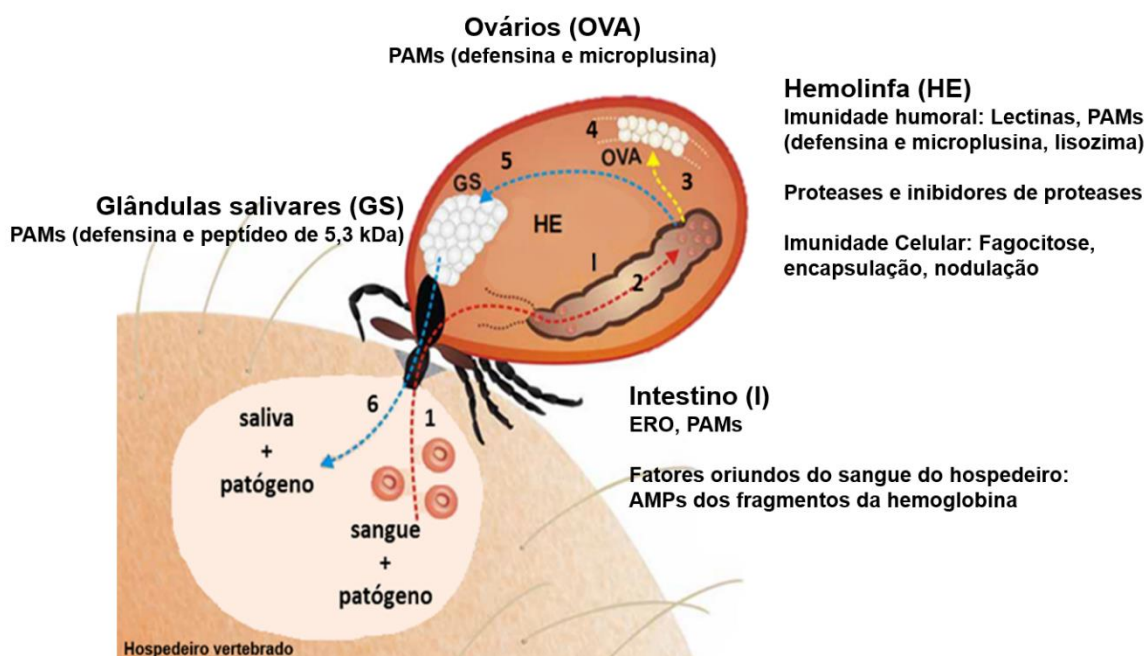
As medidas de controle da anaplasmoze bovina incluem além do controle dos vetores, a quimioprofilaxia e a vacinação. A quimioprofilaxia consiste na utilização preventiva de doses subterapêuticas de antimicrobianos nos animais, para evitar a doença clínica. Nas zonas de ocorrência de anaplasmoze nos Estados 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  $\alpha_2$ -macroglobulinas ( $\alpha_2$ 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  $\alpha_2$ 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).

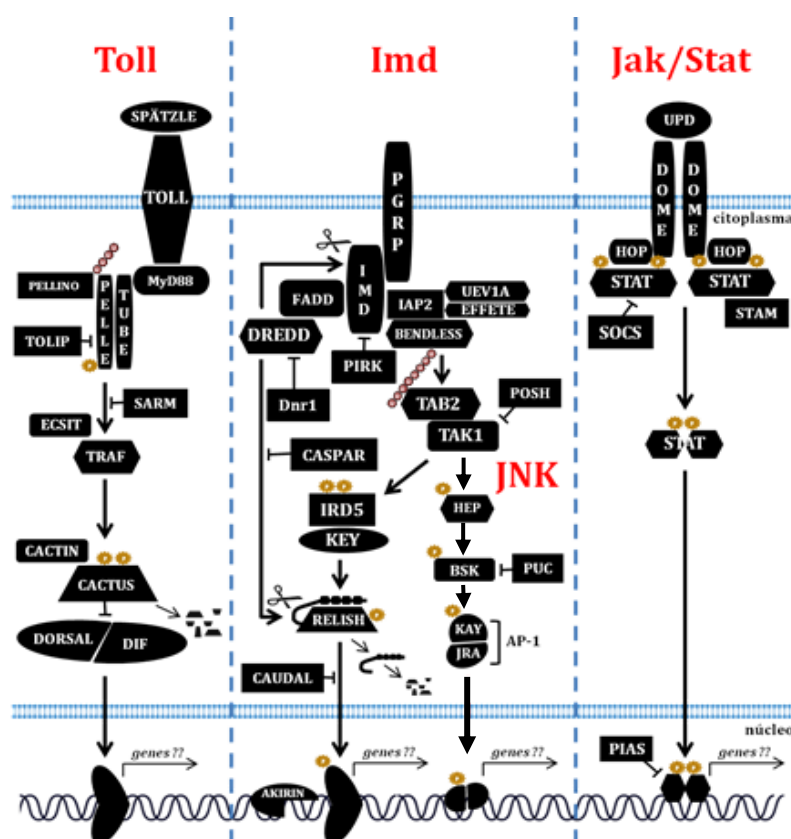
A lisozima é uma pequena proteína (de aproximadamente 14k Da) que pode servir como enzima digestiva, mas também com atividade antimicrobiana contra uma gama de diferentes microrganismos. Seu modo de ação é através da hidrólise das ligações entre o ácido-N-acetilmurâmico e os resíduos de N-acetilglicosamina, 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  $\alpha$  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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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 dipterina, 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  $\alpha$ 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.

## 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/arthrolivro-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

ESTEVEES, 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

ESTEVEES, 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

ESTEVEES, 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](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