

SANDRA PATRICIA KALIL PERDOMO

**Caracterização do estresse oxidativo das células
embrionárias do carrapato *Rhipicephalus microplus*
(BME26) em resposta à infecção por *Anaplasma
marginale***

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

São Paulo
2016

SANDRA PATRICIA KALIL PERDOMO

**Caracterização do estresse oxidativo das células
embrionárias do carrapato *Rhipicephalus microplus*
(BME26) em resposta à infecção por *Anaplasma
marginale***

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Sirlei Daffre

Versão original

São Paulo
2016

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

© reprodução total

Perdomo, Sandra Patrícia Kalil.

Caracterização do estresse oxidativo das células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus microplus* (BME26) em resposta à infecção por *Anaplasma marginale* / Sandra Patrícia Kalil Perdomo. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Sirlei Daffre.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia da interação carrapato-riquétzia.

Versão do título para o inglês: Characterization of the oxidative stress in embryonic cells from *Rhipicephalus microplus* (BME26) in response to *Anaplasma marginale* infection.

1. Anaplasmose 2. Carrapatos 3. Estresse oxidativo 4. Expressão gênica 5. Imunidade 6. Riquétzias I. Daffre, Sirlei II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB082/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sandra Patrícia Kalil Perdomo.

Título da Tese: Caracterização do estresse oxidativo das células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus microplus* (BME26) em resposta à infecção por *Anaplasma marginale* .

Orientador(a): Sirlei Daffre.

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

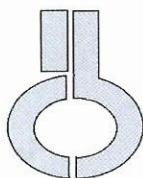
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 472/11 referente ao projeto intitulado: "*Caracterização do estresse oxidativo das células embrionárias do carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus (BME26) à infecção por Anaplasma marginale*" sob a responsabilidade de **Sandra Patrícia Kalil Perdomo**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 17 de agosto de 2011.

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

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

AGRADECIMENTOS

À Prof. Sirlei Daffre pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório.

À Prof. Andrea Fogaça pelas constantes discussões acadêmicas que contribuem ao meu crescimento científico e como ser humano.

Aos que foram e ainda são integrantes do Laboratório de Bioquímica e Imunologia de Artrópodes, especialmente a Eliane Esteves, Thaís Bifano, Janaína Peixoto, Paula Pohl, Maria Fernanda Galletti e Rafael Rosa. Ele fizeram este processo menos doloroso e mais amoroso.

Ao Prof. Mauro pela constante ajuda na discussão dos experimentos.

Ao Laboratório do Prof. Pedro Lagerblad Oliveira e muito especialmente a Ana Carolina Gandara e a Felipe Dias, que sempre estiveram disponíveis para me ajudar.

Ao Prof. Francisco Laurindo que me permitiu utilizar os equipamentos do seu laboratório, a Dra. Denise Fernandes pela discussão de resultados e a Maria Bertoline, que operou o incessantemente o HPLC para processamento das minhas amostras.

Aos meus pais que com muita paciência e amor me acompanharam e apoiaram sempre.

Ao meu *crew*: Jenicer Yasunaka, Janaína Peixoto, Ismael Sauter, Lina Borda e Rosana Duque. Gente muito do bem que me faz muito feliz tê-la por perto.

Aos funcionários técnicos e administrativos, sem eles nada poderia ser possível aqui!

A Mario Costa, que é um especialista em entender como funciona a minha cabeça.

Obrigada por fazer acontecer. Obrigada por existir. Você é a minha melhor metade!

A CNPq pelo auxílio concedido e pagamento da minha bolsa e eventos.

Por fim, agradeço ao Brasil por me permitir viver e sonhar durante 9 maravilhosos anos da minha vida.

First you jump off the cliff and built your wings on the way down

Ray Bradbury

RESUMO

Kalil S. Caracterização do estresse oxidativo das células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus microplus* (BME26) em resposta à infecção por *Anaplasma marginale*. [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) é essencial na resposta imune dos artrópodes aos microrganismos. Em insetos, as ERO e ERN estão envolvidas no controle tanto de patógenos quanto da microbiota. Porém, o conhecimento do papel do sistema redox na interação de carrapatos com patógenos, bem como com sua microbiota, é limitado. Assim, este estudo teve como objetivo a caracterização do estresse oxidativo das células embrionárias do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (BME26) em resposta à infecção por *A. marginale*. Inicialmente, mostrou-se que *A. marginale* invade as células BME26 durante a primeira hora de contato com as mesmas. Um estudo transcriptômico em larga escala foi realizado para determinar o perfil de expressão de 16 genes codificadores de proteínas que estão envolvidas na produção e destoxificação de ERO e ERN após diferentes desafios microbianos. Para tal, foram utilizadas duas riquetsias, uma transmitida pelo *R. microplus* (*A. marginale*) e uma não transmitida (*Rickettsia rickettsii*), uma bactéria Gram-positiva (*Micrococcus luteus*), uma bactéria Gram-negativa (*Enterobacter cloacae*) e uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). *A. marginale* ocasionou uma redução nos transcritos das enzimas pró-oxidantes dual oxidase e oxidase do retículo endoplasmático 72 horas após a infecção. Apenas o gene que codifica a óxido nítrico sintase teve uma indução em 72 horas após infecção. Em contrapartida, os genes codificadores das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, glutatona S-transferase, tioredoxina, tioredoxina redutase e peroxirredoxina foram todos induzidos. O perfil de expressão gênica pela infecção por *R. rickettsii* e os outros microrganismos foi diferente do obtido com *A. marginale*, uma vez que se detectou uma maior indução dos genes oxidantes e repressão dos genes antioxidantes. O silenciamento dos genes da catalase, glutatona peroxidase, tioredoxina redutase e proteína resistente à oxidação por RNA de interferência indicaram o envolvimento da resposta redox no controle da infecção por *A. marginale*. No entanto, não se detectou a produção de peróxido de hidrogênio e das atividades enzimáticas da catalase e da peroxidase pela infecção por essa riquetsia. O conjunto de resultados obtidos demonstram que o estresse oxidativo é importante no controle da infecção por *A. marginale* pelas células BME26, podendo ter implicações na capacidade vetorial do *R. microplus* na transmissão desse patógeno.

Palavras-chave: **Anaplasrose. Carrapatos. Estresse oxidativo. Expressão gênica. Imunidade. Riquetsias. RNA de interferência.**

ABSTRACT

Kalil S. Characterization of the oxidative stress in embryonic cells from *Rhipicephalus microplus* (BME26) in response to *Anaplasma marginale* infection. [Ph.D Thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The production of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (ERN) is essential in the immune response of the arthropods to microorganisms. In insects, ROS and RNS are involved in the control of both pathogens and microbiota. However, the knowledge on the role of the redox system in tick-pathogen interactions as well as their microbiota is limited. Therefore, the aim of this study was the characterization of the oxidative stress of the embryonic cell line BME26 from the cattle tick *Rhipicephalus microplus* in response to *A. marginale* infection. Firstly, it was shown that *A. marginale* invade BME26 cells during the first 1 hour of contact with them. A high-throughput qPCR approach was used to determine the expression profile of sixteen genes encoding proteins involved in either production or detoxification of ROS and RNS in response to different microbial challenges. For such, we used two rickettsiae, one transmitted (*A. marginale*) and the other one not transmitted (*Rickettsia rickettsii*) by *R. microplus*, one Gram-positive bacterium (*Micrococcus luteus*), one Gram-negative bacterium (*Enterobacter cloacae*) and one yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *A. marginale* caused a down-regulation of the genes encoding the pro-oxidant enzymes dual oxidase and endoplasmic reticulum oxidase in 72 hours after infection. Only, the coding gene of nitric oxide synthase was induced in 72 hours after *A. marginale* infection. In contrast, the genes encoding the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, thioredoxin, thioredoxin reductase, and peroxiredoxin were induced. The gene expression pattern in response to *R. rickettsii*, *M. luteus*, *E. cloacae* and *S. cerevisiae* was different from that triggered by *A. marginale* challenge, with induction of pro-oxidant genes and down-regulation of antioxidant genes. The knockdown of genes encoding catalase, glutathione peroxidase, thioredoxin reductase and oxidation resistance 1 by interference RNA suggests that redox response play a role in the control of infection by *A. marginale*. Nonetheless, the production of hydrogen peroxide and the activity of both catalase and peroxidase were not observed by *A. marginale* infection. Our dataset have shown the importance of the oxidative stress to control *A. marginale* infection by BME26 cells and might have implications on the vectorial capacity of *R. microplus* in transmission of this pathogen.

Key words: **Anaplasmosis. Gene expression. Interference RNA. Oxidative stress. Rickettsiae. Ticks imunity.**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação do ciclo de <i>A. marginale</i>	23
Figura 2 - Esquema da estrutura das enzimas da família NOX.....	31
Figura 3 - Esquema da produção e destoxificação de ERO e ERN na homeostase das células	33
Figura 4 - Cinética da infecção de <i>A. marginale</i> nas células BME26	70
Figura 5 - Células BME26 infectadas por <i>A. marginale</i> GFP analisadas por microscopia confocal.....	72
Figura 6 - Células BME26 infectadas por <i>A. marginale</i> analisadas por microscopia eletrônica de transmissão.....	74
Figura 7 - Perfil da expressão gênica das células BME26 desafiadas por diferentes microrganismos	78
Figura 8 - Perfil da expressão do gene pró-oxidante <i>RmDUOX2</i> nas células BME26 infectadas por <i>A. marginale</i>	81
Figura 9 - Perfil da expressão dos genes antioxidantes <i>RmMnSOD</i> , <i>RmCAT</i> e <i>RmGPX</i> nas células BME26 infectadas por <i>A. marginale</i>	82
Figura 10 - Efeito do triplo silenciamento dos genes <i>RmCAT</i> , <i>RmGPX</i> e <i>RmTRXR</i> nas células BME26 infectadas por <i>A. marginale</i>	84
Figura 11 - Alinhamento das sequências da proteína OXR1 de diferentes espécies de artrópodes	86
Figura 12 - Efeito do silenciamento do gene <i>RmOXR1</i> nas células BME26 infectadas por <i>A. marginale</i> e na modulação da expressão dos genes <i>RmMnSOD</i> , <i>RmCAT</i> e <i>RmGPX</i>	87
Figura 13 - Dosagem de H ₂ O ₂ nas células BME26 infectadas por <i>A. marginale</i>	89
Figura 14 - Dosagem da atividade da CAT intracelular nas células BME26 infectadas por <i>A. marginale</i>	90
Figura 15 - Dosagem da atividade da GPX intracelular nas células BME26 infectadas por <i>A. marginale</i>	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de oligonucleotídeos usados para PCR, qPCR, RT-qPCR e síntese de <i>dsRNA</i>	59
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-NO ₂	Grupo nitro
AmMSP5	Principal proteína 5 da superfície de <i>Anaplasma marginale</i>
AT	Aminotriazol
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
Cq	Ciclo de quantificação
Cu/ZnSOD	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAg	DNA genômico
ds	<i>Double strand</i> (Dupla fita)
DUOX	Dual oxidase
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERO1	Oxidase do retículo endoplasmático 1
EST	Etiqueta de sequência expressa
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GFP	Proteína verde fluorescente
RrGLTA	Citrato sintase
GLUDY	Glutamato desidrogenase
GPX	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona-S-transferase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

HNO ₂	Ácido nitroso
HOCl	Ácido hipocloroso
HRP	Peroxidase de rábano
IMD	Deficiência imunológica
IMPer	Peroxidase imunomodulatória
JAK/STAT	Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K ⁺	Íon potássio
KDa	Quilodalton
LOOH	Hidroperóxido de lipídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
MnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
MPO	Mieloperoxidase
MSP	Principais proteínas de superfície
mU	Miliunidades
N ₂	Nitrogênio
N ₂ O ₃	Anidrido nitroso
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaOH	Hidróxido de sódio
NO [•]	Óxido nítrico
NO ₂ [•]	Dióxido de Nitrogênio
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₂ Cl	Cloreto de nitrila
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
O ₂	Oxigênio
OH [•]	Radical hidroxil

ONOO ⁻	Peroxinitrito
OXR1	Proteína de resistência à oxidação
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados a patógenos)
pb	Pares de bases
PBS	tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PfMSP1	Proteína da superfície de merozoíta de <i>Plasmodium falciparum</i>
PGN	Peptidoglicano
PHGPX	Glutaciona peroxidase de hidroperóxidos de lipídeos
PKC	Proteína quinase C
PMA	Acetato miristato de forbol
PRR	Receptores de reconhecimento de patógenos
PRX	Peroxirredoxina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
rMP	Microplusina recombinante
RIBS3A	Proteína ribossomal S3A
ROO [•]	Radical peroxil
RO [•]	Radical alcoxil
ROOH	Hidroperóxido orgânico
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa
SOD	Superóxido dismutase
T4SS	Sistema de secreção do tipo 4
T7	Fago T7
TE	Tampão Tris-EDTA
TEP	Proteína contendo domínio tioéster
TLDC	Proteínas contendo os domínios TBC e LysM

TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TRX	Tiorredoxina
TRXR	Tiorredoxina redutase
U/mL	Unidades por mililitro
x g	Gravidade

LISTA DE SÍMBOLOS

$\%$	Porcentagem
Δ	Delta
$^\circ$	Grau

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Os carrapatos como vetores de doenças infecciosas	19
1.1.1 <i>Anaplasmosse bovina</i>	21
1.2 O sistema imune de carrapatos	23
1.2.1 <i>Resposta celular</i>	24
1.2.2 <i>Resposta humoral</i>	25
1.2.2.1 <i>Estresse oxidativo</i>	30
<u>1.2.2.1.1 <i>influência do estresse oxidativo na microbiota intestinal de artrópodes</i></u>	<u>36</u>
1.4 Interações moleculares entre carrapatos e patógenos	38
1.4.1 <i>B. burgdorferi</i> e <i>I. scapularis</i>	38
1.4.2 <i>A. phagocytophilum</i> , <i>Ehrlichia chaffeensis</i> e <i>Ixodes</i> sp	39
1.4.3 <i>R. rickettsii</i> e <i>A. aureolatum</i>	42
1.4.4 <i>Babesia</i> sp, <i>H. longicornis</i> e <i>Rhipicephalus</i> sp.....	42
1.4.5 <i>Anaplasma marginale</i> , <i>D. variabilis</i> e <i>R. microplus</i>	43
1.4.5.1 <i>Implicação do estresse oxidativo no controle da infecção por A. marginale</i>	46
2 OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo geral	48
2.2 Objetivos específicos	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Material Biológico	50
3.1.1 <i>Células embrionárias</i>	50
3.1.2 <i>Microrganismos</i>	50
3.1.2.1 <i>Quantificação de A. marginale e R. rickettsii por qPCR</i>	50
3.1.2.2 <i>Preparação de inóculo de microrganismos termo-inativados</i>	51
3.1.2.3 <i>Preparação do inóculo de R. rickettsii em células BME26</i>	51
3.1.2.4 <i>Preparação do inóculo de A. marginale</i>	52
<u>3.1.2.4.1 <i>Em sangue bovino</i></u>	<u>52</u>
<u>3.1.2.4.2 <i>Em células ISE6</i></u>	<u>52</u>
3.2 Extração de RNA, DNA e síntese do cDNA	53
3.3 Tratamento das células BME26 com os microrganismos	54
3.4 Cinética de crescimento de A. marginale nas células BME26	54
3.5 Imunofluorescência	55

3.6 Microscopia eletrônica de transmissão	56
3.7 Análise da expressão gênica das células BME26 expostas a diferentes desafios microbianos	57
3.7.1 <i>Oligonucleotídeos</i>	57
3.7.2 <i>Desafios microbianos.....</i>	57
3.7.2.1 RT-qPCR em larga escala	62
3.7.2.2 RT-qPCR em pequena escala	63
3.7.3 <i>Silenciamento de genes antioxidantes por RNAi.....</i>	64
3.7.3.1 Produção de dsRNA	64
3.7.3.2 Tratamento das células BME26 com dsRNAs e infecção com <i>A. marginale</i>	65
3.7.3.3 Avaliação do silenciamento gênico e quantificação de <i>A. marginale</i> nas células BME26 tratadas com as dsRNAs.....	65
3.8 Dosagem de H₂O₂ e da atividade da CAT e GPX.....	66
3.8.1 <i>Dosagem de H₂O₂ em células BME26 incubadas com A. marginale.....</i>	66
3.8.2 <i>Dosagem da atividade CAT intracelular em células infectadas com A. marginale.....</i>	67
3.8.3 <i>Dosagem da atividade GPX intracelular em células infectadas com A. marginale</i>	68
4 RESULTADOS	69
4.1 Estabelecimento da infecção de <i>A. marginale</i> nas células BME26.....	70
4.2 Perfil da expressão de genes envolvidos na produção e destoxificação de ERO e ERN nas células BME26 desafiadas por diferentes microrganismos	75
4.3 Perfil da expressão de genes que estão envolvidos na produção e destoxificação do H₂O₂ nas células BME26	80
4.4 Efeito do silenciamento de genes antioxidantes na infecção de células BME26 por <i>A. marginale</i>.....	83
4.5 Quantificação da produção de H₂O₂ e atividade da CAT e GPX em células BME26 infectadas por <i>A. marginale</i>.....	88
5 DISCUSSÃO	92
5.1 Infecção das células BME26 por <i>A. marginale</i>.....	93
5.2 Perfil transcriptômico de genes envolvidos na produção e destoxificação das ERO e ERN.....	96
5.3 Os genes antioxidantes são importantes para a manutenção da viabilidade de <i>A. marginale</i> nas células BME26.....	100
5.4 <i>A. marginale</i> não induz a produção de H₂O₂ e não modula a atividade das enzimas CAT e GPX na linhagem celular BME26.....	103
6 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS*	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os carrapatos como vetores de doenças infecciosas

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Parasitiformes e subordem Ixodida. Atualmente mais de 900 espécies de carrapatos estão classificadas em duas grandes famílias, Ixodidae e Argasidae. Essa classificação tem como base principal as características da carapaça. As espécies pertencentes à família Ixodidae possuem um escudo dorsal quitinoso ou rígido e são conhecidos como carrapatos duros, enquanto que as espécies da família Argasidae carecem do escudo e são conhecidos como carrapatos moles. Os carrapatos da família Argasidae parasitam diversos hospedeiros e possuem de dois a oito estádios na fase ninfa. Durante a alimentação, as ninfas se alimentam rapidamente em seus hospedeiros e a fase adulta se alimenta repetidamente. As fêmeas se acasalam fora do hospedeiro e após cada alimentação, ovipositam um número limitado (algumas centenas) de ovos. Os carrapatos moles tem um ciclo de vida bastante longo, sendo capazes de sobreviver sem se alimentar por meses. Em contraste, os carrapatos da família Ixodidae possuem no seu ciclo um único estágio de cada fase (larva, ninfa e adulto). Gêneros dessa família como *Ixodes*, *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Haemaphysalis* parasitam três hospedeiros, podendo se alimentar em hospedeiros diferentes em cada fase do seu ciclo. A alimentação dessa família de carrapatos é lenta e dura vários dias, dependendo da espécie. As fêmeas adultas se acasalam no hospedeiro e após o ingurgitamento, desprendem-se. Após a oviposição de milhares de ovos, morrem (Kopáček et al., 2010; Nava et al., 2009).

Os carrapatos constituem o segundo grupo de vetores que transmitem a maior variedade de patógenos, depois dos mosquitos. Dentre estes patógenos existem vírus, bactérias e protozoários que provocam importantes doenças ao homem e aos animais domésticos e silvestres (Jongejan, Uilenberg, 2004). O sucesso da transmissão de diferentes patógenos é dado pelas características fisiológicas dos carrapatos em decorrência da sua adaptação à alimentação sanguínea relativamente de longa duração. Durante o repasto sanguíneo, diversas moléculas secretadas da saliva dos carrapatos modulam o sistema imune do hospedeiro, facilitando a aquisição e transmissão dos patógenos (Francischetti et al., 2010). A colonização dos patógenos no intestino é favorecida pela ausência da digestão

extracelular, a qual o carrapato realiza dentro de vesículas digestivas das células do intestino. Adicionalmente, a microbiota intestinal é essencial para o desenvolvimento dos carrapatos, assim como a transmissão dos patógenos (Narasimhan, Fikrig, 2015). Os carrapatos são de grande importância médica e veterinária, estando envolvidos na epidemiologia de doenças entre humanos e animais. As principais doenças transmitidas por carrapatos ao homem são: doença de Lyme (causada pela espiroqueta *Borrelia burgdorferi*), encefalites (causadas por Flavivírus, tais como vírus da encefalite da Europa Central, vírus da encefalite siberiana do carrapato e o vírus da encefalite do carrapato do extremo oriente), anaplasmoze granulocítica (causada pela riquetsia *Anaplasma phagocytophilum*) e a febre maculosa das Montanhas Rochosas (causada pela riquetsia *Rickettsia rickettsii*). As principais doenças transmitidas por carrapatos aos animais são: anaplasmoze bovina (causada pela riquetsia *Anaplasma marginale*), babesiose (causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*), teileriose (causada pelos protozoários pertencentes ao gênero *Theileria*) e febre suína africana (causada pelo vírus da peste suína africana) (Sonenshine, Roe, 2014).

O impacto econômico causado por infestações de ectoparasitas na bovinocultura é enorme, sendo os carrapatos do gênero *Rhipicephalus* os de maior importância veterinária, em particular, a espécie *R. microplus*, que está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Estrada-Peña et al., 2006). As infestações por este carrapato tem como consequência, a diminuição na produção de leite e do peso do gado, representando perdas econômicas superiores a 3 milhões de dólares no Brasil durante o ano de 2011 (Grisi et al., 2014). Adicionalmente, *R. microplus* pode transmitir *A. marginale*, agente etiológico da anaplasmoze bovina, uma grave doença que afeta mundialmente a bovinocultura de corte e de leite, devido a sua alta prevalência e aos prejuízos por ela causados. Os prejuízos econômicos causados por essa doença, além da perda de peso e diminuição na produção do leite, incluem aborto, alto custo de tratamento e óbito (Kocan et al., 2010).

1.1.1 Anaplasmosose bovina

A anaplasmosose bovina (AB) está amplamente distribuída nos países tropicais e subtropicais do mundo, sendo *R. microplus* e *R. annulatus* os principais vetores do seu agente etiológico, a riquetsia *Anaplasma marginale*. Essa doença acomete, além do gado bovino, outros ruminantes como búfalos, bisões, antílopes africanos, veados, os quais podem estar persistentemente infectados (Kuttler, 1984).

A AB é endêmica em todos os países de América Latina, com exceção das áreas geográficas desérticas como as zonas montanhosas da cordilheira dos Andes (Guglielmone, 1995). A vacinação contra a AB é uma alternativa econômica e efetiva de controle que inclui o uso de bactérias vivas atenuadas ou mortas. No entanto, nenhuma destas vacinas evita a infecção de animais que estão persistentemente infectados por *A. marginale*. Esses animais contribuem para a disseminação da doença, permitindo a transmissão tanto mecânica quanto biológica do patógeno (Kocan et al., 2010). No Brasil e em outros países da América Latina, a cepa *A. marginale* subsp. *centrale* também tem sido utilizada como vacina, conferindo imunidade cruzada contra *A. marginale*. Entretanto, devido às diversas cepas da bactéria, verifica-se diferenças significativas na eficácia desta vacina em diferentes regiões do mundo. Além disso, a vacina viva de *A. marginale* subsp. *centrale* provoca uma infecção que pode promover reações clínicas adversas nos bovinos vacinados (Sacco et al., 2001).

Além da vacinação, a prevenção da AB é realizada pela utilização de antibióticos em animais sadios de modo a evitar a doença clínica. Nas zonas de ocorrência de AB nos EUA, os antibióticos são utilizados em doses subterapêuticas e é frequente o uso de clortetraciclina adicionada à ração dos animais. No Brasil, o uso de antibióticos na ração não é empregado, contudo é comum o uso preventivo de antibióticos injetáveis indicados para o tratamento de anaplasmosose, destacando-se a oxitetraciclina (particularmente as formulações de longa ação), e em menor grau o dipropionato de imidocarb (Mathers et al., 2011; Ribeiro et al., 2003).

No bovino, *A. marginale* infecta unicamente os eritrócitos, localizando-se em inclusões ligadas à membrana, contendo de quatro a oito colônias. O período de

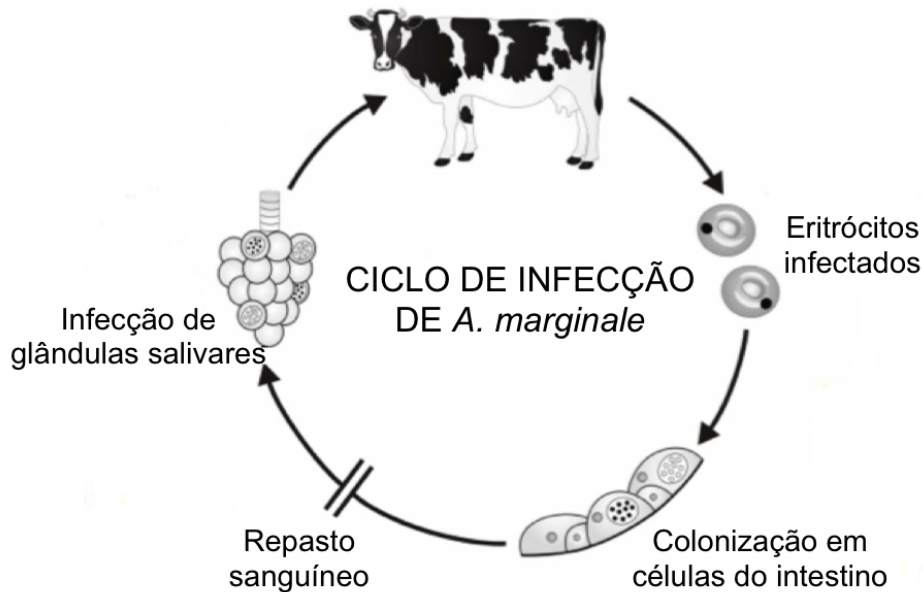
incubação da doença varia de 7 a 60 dias dependendo do inóculo inicial e, após a detecção da infecção, o número de eritrócitos parasitados aumenta exponencialmente. Durante a infecção aguda, *A. marginale* pode invadir 70% ou mais dos eritrócitos bovinos (Richey, 1981). Os bovinos que sobrevivem à fase aguda entram na fase crônica, que é caracterizada por apresentar baixos níveis de riquetsemia e persistência na infecção, sem ser detectada no esfregaço sanguíneo. Na fase crônica, os picos de riquetsemia ocorrem em intervalos de dois meses, aproximadamente, demonstrando a multiplicação cíclica de *A. marginale*, a qual é acompanhada de variantes antigênicas na sua superfície celular, não sendo reconhecidas pelo sistema imune do bovino. Os eritrócitos infectados são fagocitados por células do sistema reticuloendotelial, desencadeando o desenvolvimento de anemia leve a grave e icterícia. Os sintomas clínicos incluem febre, perda de peso, aborto, letargia, icterícia e morte (French et al., 1998).

O ciclo de vida de *A. marginale* no carrapato vetor é dependente da alimentação do mesmo, que adquire grandes quantidades de eritrócitos infectados contidos no repasto sanguíneo (Figura 1). No carrapato, a infecção inicial de *A. marginale* ocorre nas células do intestino que posteriormente, se dissemina a outros tecidos. No entanto, os mecanismos que medeiam a migração da bactéria aos diferentes órgãos no carrapato ainda são desconhecidos. Essas bactérias invadem o epitélio do intestino do vetor onde se replicam por divisão binária, desenvolvendo-se na forma reticulada ou vegetativa e gerando colônias contendo centenas de bactérias. Essas formas reticuladas se transformam em formas densas e infectantes que saem do epitélio intestinal e migram para as glândulas salivares, onde ocorre a transmissão a um novo hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo subsequente (Kocan et al., 2003).

As fases de larva, ninfa e o macho adulto de *R. microplus* têm um papel crítico na transmissão de *A. marginale* (Kocan et al., 2003). Apesar de *R. microplus* parasitar um único hospedeiro, pode migrar de um bezerro a outro devido ao hábito gregário dos bovinos e, assim, disseminar a infecção da bactéria. No caso de fêmeas de *R. microplus*, após se alimentarem, se desprendem do hospedeiro e iniciam o processo de oviposição. A fêmea morre após a postura dos ovos e as larvas que deles eclodem são livres de infecção. Ou seja, a transmissão biológica de *A.*

marginale ocorre de estágio para estágio (interestadial) ou dentro do mesmo estágio (intraestadial), enquanto que a transmissão transovariana por *R. microplus* não ocorre (Esteves et al., 2015).

Figura 1 - Representação do ciclo de *A. marginale*



Esquema da aquisição e transmissão de *A. marginale* no intestino e glândulas salivares de *R. microplus* após o repasto sanguíneo. *A. marginale* infecta as células do intestino se desenvolvendo em duas formas de colônia: forma reticulada (forma replicativa) e forma densa (forma infectiva). As bactérias colonizam outros tecidos incluindo glândulas salivares, sendo transmitidas pela saliva para o hospedeiro vertebrado. Fonte: Adaptado de Hajdušek et al., 2013.

1.2 O sistema imune de carrapatos

Os carrapatos possuem mecanismos eficientes de defesa que permitem o controle de diversos microrganismos, incluindo os patógenos que eles transmitem. Assim como outros invertebrados, o sistema imune dos carrapatos é do tipo inato e envolve respostas celulares e humorais. As respostas celulares são mediadas pelas células circulantes da hemolinfa, denominadas hemócitos, como os granulócitos (tipo I e II) e os plasmatócitos, que medeiam os processos de fagocitose,

encapsulação e nodulação. As respostas humorais incluem a produção de moléculas solúveis, como as proteínas de reconhecimento dos microorganismos [por exemplo as lectinas e as proteínas que contêm tioéster (TEP)], peptídeos antimicrobianos (PAM) e espécies reativas de oxigênio (ERO) (Kopáček et al 2010; Smith, Pal, 2014).

1.2.1 Resposta celular

A fagocitose de diversos materiais inertes ou de microorganismos foi demonstrada em várias espécies de carrapatos. O processo de fagocitose foi verificado no carrapato *Ornithodoros moubata*, que mediante a inoculação de esferas de poliestireno fluorescente na hemocele, foram fagocitadas pelos plasmatócitos e granulócitos circulantes (Inoue et al., 2001). Este processo também foi observado usando microorganismos vivos como a levedura *Candida haemulonii* e a bactéria *Chryseobacterium indologenes* (Buresova et al., 2006; Loosova et al., 2001). Da mesma forma, foi observada a fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* quando inoculada na hemocele de *R. microplus* e foi demonstrado que os plasmatócitos estão envolvidos neste processo (Pereira et al., 2001). Esta resposta celular está associada a respostas humorais como a produção de TEP, ERO e PAM (Buresova et al., 2009; Buresova et al., 2011; Pereira et al., 2001).

A encapsulação em carrapatos foi demonstrada usando resina de Epon e araldite implantadas sob a cutícula de *D. variabilis*. Este processo foi mediado por granulócitos do tipo I, II e plasmatócitos, com a formação de uma cápsula ao redor do implante, que por sua vez, foi envolvida por uma matriz celular (Eggenberger et al., 1990). O processo de nodulação também foi verificado em ensaios realizados com o mesmo carrapato, que após a inoculação de *Escherichia coli* na hemocele, vários agregados de bactérias mortas rodeadas por hemócitos foram formados no local da inoculação (Ceraul et al., 2002).

1.2.2 Resposta humoral

A resposta humoral no carrapato inclui principalmente a produção de lectinas, TEP e PAM. As lectinas causam a agregação de microrganismos, permitindo sua destruição mediada pelos hemócitos circulantes. Acredita-se que as lectinas de artrópodes sejam análogas funcionais das imunoglobulinas devido à sua especificidade no reconhecimento de carboidratos na superfície dos patógenos (Grubhoffer, 2008). Em carrapatos, as lectinas foram encontradas na hemolinfa, intestino e glândulas salivares e geralmente, tem afinidade por ácido siálico, N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) e galactose (Sterba et al., 2011). Existe uma lectina bem caracterizada, denominada Dorin M, que pertence a uma família de proteínas com domínio do tipo fibrinogênio (FREP). Esta lectina foi isolada de *O. moubata*, sendo produzida principalmente nos hemócitos do carrapato e contendo na sua extremidade carboxi-terminal o domínio de fibrinogênio, que é encontrado em invertebrados como também em vertebrados (Rego et al., 2006). Os carrapatos *I. scapularis* e *I. ricinus* contêm genes que codificam uma grande variedade de FREP, denominadas ixoderinas. Particularmente em *I. ricinus*, o gene da ixoderina A é expresso em hemócitos, glândulas salivares e intestino enquanto que o da ixoderina B é especificamente expresso nas glândulas salivares (Rego et al., 2005). Sugere-se que algumas FREP tenham um papel importante na ativação do sistema do tipo complemento de carrapatos.

Os carrapatos são os únicos entre os invertebrados que possuem representantes das quatro classes principais de proteínas que contém tioéster: (i) α 2-macroglobulinas com atividade de inibidores de proteases, (ii) componentes C3, C4 e C5 do sistema do tipo complemento, (iii) TEP e (iv) proteínas relacionadas a macroglobulinas (Buresova et al., 2011).

As α 2-macroglobulinas foram encontradas na hemolinfa de carrapatos, com função de inibidor de proteases e protegem dos ataques proteolíticos gerados por microrganismos invasores (Buresova et al., 2011). Em *I. ricinus* foi caracterizada uma α 2-macroglobulina denominada IrAM, que inibe a metaloprotease secretada pela bactéria *C. indologenes* e está relacionada especificamente ao processo de fagocitose (Buresova et al., 2009).

No genoma de *I. scapularis* foram encontrados componentes relacionados ao sistema tipo complemento. A convertase tipo C3 é uma enzima que contém uma estrutura multidomínio similar ao fator C2/Bf e ao fator C sensível ao lipopolissacarídeo (LPS) (Ariki et al., 2008). Posteriormente, foram identificadas sequências relacionadas aos fatores C3, C4 e C5 chamados de IsAm5, IsAM6 e IsAM7, respectivamente. Estes três componentes tipo complemento possuem um domínio putativo de anafilotoxinas e na extremidade carboxi-terminal, contem um domínio tipo netrina/C345C, sendo característico dos componentes C3, C4 e C5 em vertebrados (Buresova et al., 2011). Especificamente foram identificadas três moléculas tipo C3, mostrando que uma delas (C3-3) é absolutamente necessária para a fagocitose de *C. indologenes* e *E. coli* (Buresova et al., 2011). Adicionalmente em *I. scapularis* foram identificadas sequências que codificam nove proteínas que pertencem ao grupo das TEP sendo denominadas como IsAM1-9. Dentre essas proteínas, as chamadas IsASm1 e IsAM4 pertencem às α 2-macroglobulinas, a IsAM3 está relacionada com TEP de insetos, enquanto que a IsAM8 e IsAM9 tem alta similaridade com as TEP de insetos recentemente chamadas de macroglobulinas relacionadas ao complemento (Buresova et al., 2011).

Os carrapatos contam ainda com a produção de PAM que agem diretamente contra os patógenos invasores. Os PAM são sintetizados nas glândulas salivares, trato reprodutivo, trato digestório, hemócitos, corpo gorduroso e secretados para a saliva, lúmen do intestino e hemolinfa. Dentre elas, temos as defensinas, que são peptídeos catiônicos contendo seis resíduos de cisteína envolvidos em três pontes dissulfeto, isoladas de *R. microplus* (Fogaça et al., 2004). A varisina é um PAM que faz parte da família das defensinas e que foi isolado da hemolinfa de *D. variabilis*, mostrando ação microbicida contra *Bacillus subtilis* (Ceraul et al., 2002). A longicornisina é uma defensina-like que foi purificada das glândulas salivares de *H. longicornis*, demonstrando potente atividade antimicrobiana contra a bactéria resistente a antibióticos *Helicobacter pylori* e sugerindo ser um potencial candidato para desenvolvimento de antibióticos (Lu et al., 2010).

Um outro PAM isolado de *R. microplus* é a microplusina. A microplusina foi purificada da hemolinfa do carrapato, sendo formada por 90 aminoácidos, dentre eles seis resíduos de cisteína, e as extremidades amino e carboxi-terminal são ricas

em resíduos de histidina (Fogaça et al., 2004). A atividade antimicrobiana desse PAM está relacionada à sua propriedade de quelar íons cobre. O peptídeo mostrou um efeito bacteriostático contra a bactéria *Micrococcus luteus*, devido ao sequestro dos íons cobre pelas histidinas das extremidades amino e carboxi-terminal do peptídeo, comprometendo assim o processo de respiração bacteriana (Silva et al., 2009). A hebraína, similar à microplusina, é formada por 102 aminoácidos que inclui seis resíduos de cisteínas e no extremo carboxi-terminal, é rico em resíduos de histidina. Este PAM foi isolado da hemolinfa do carrapato *A. hebraetum* e possui atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *C. glabrato* (Lai et al., 2004).

A ixodidina é um PAM isolado dos hemócitos de *R. microplus* formado por 65 aminoácidos contendo cinco pontes dissulfeto. Este peptídeo apresenta atividade contra *E. coli* e *M. luteus*, como também atividade inibitória de serina proteinases (elastase e quimiotripsina), podendo estar envolvido no controle das cascatas proteolíticas do sistema imune de artrópodes. Portanto, a ixodidina poderia ter diferentes funções na hemolinfa, atuando diretamente contra microrganismos invasores e/ou mediando respostas imunes na hemocele de *R. microplus* (Fogaça et al., 2006).

Adicionalmente, a digestão da hemoglobina bovina proveniente da alimentação do carrapato, é uma importante fonte de produção de PAM. Vários fragmentos derivados da digestão de hemoglobina e que possuem atividade antimicrobiana (hemocidinas) foram identificados no intestino de *R. microplus*. Um deles é um peptídeo de 3,2 kDa (Hb 33-61) com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos (Fogaca, 1999). Posteriormente, foram caracterizadas duas proteinases (uma aspártico e uma cisteína proteinase) do intestino de *R. microplus* que estão envolvidas no processo da digestão da hemoglobina, gerando peptídeos com atividade antimicrobiana. A hidrólise *in vitro* da hemoglobina resultou na geração do peptídeo Hb 40-63, que possui atividade contra *C. albicans*, e do peptídeo Hb 34-63, com similaridade ao PAM Hb 33-61 e com atividade antifúngica (Cruz et al., 2010). Do mesmo modo, um peptídeo denominado Hb 98-114 mostrou um efeito de permeabilizar a membrana de *C. albicans* (Belmonte et al, 2012). Considerando as atividades antimicrobianas das hemocidinas, as mesmas podem

ter um papel importante no intestino do carrapato na proteção contra infecções (Belmonte et al, 2012).

Outros PAMs não relacionados aos peptídeos descritos acima foram isolados em diversas espécies de carrapatos. Os peptídeos Ixosin A e Ixosin B foram isolados das glândulas salivares de *I. sinensis* (Liu et al., 2008). ISAMP é um PAM de 5,3 kDa isolado da saliva de *I. scapularis* com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Pichu et al., 2009). Além dos PAMs, existem proteínas com atividade antimicrobiana que, provavelmente, contribuem à imunidade no intestino dos carrapatos. A lisozima tipo C foi purificada do intestino de *O. moubata* e tem atividade antimicrobiana contra *M. luteus*. Esta lisozima compartilha alguns domínios conservados com lisozimas encontradas no trato digestório de insetos ou em estômagos de ruminantes (Grunclová et al., 2003).

A transcrição dos PAM e de outros efetores do sistema imune é mediada na ativação das vias de sinalização Toll, IMD (do inglês, *Immune deficiency*) ou JAK/STAT (do inglês, *Janus Kinase/signalling transducer and activator of transcription*) por microrganismos. Em artrópodes como *Drosophila melanogaster*, a via Toll é ativada por bactérias Gram-positivas e fungos (Lemaitre, 2004) e em *Aedes aegypti* é ativada por vírus (Xi et al., 2008). A via IMD é ativada pela presença do ácido diaminopimélico (DAP) e peptidoglicano (PGN) presentes na parede celular da maioria de bactérias Gram-negativas (Kleino, Silverman, 2014) e a via JAK/STAT, é ativada pela presença de citocinas e fatores de crescimento em *Drosophila* (Agaisse, Perrimon, 2004). A ativação dessas três vias de sinalização resultam na expressão de PAM específicos. Em carrapatos, foi demonstrado que a via JAK/STAT está envolvida na resposta à infecção por *A. phagocytophilum*. Mediante RNA de interferência (RNAi), o silenciamento da via JAK/STAT em *I. scapularis* gerou um aumento no número de bactérias nas glândulas salivares e na hemolinfa do carrapato e, conseqüentemente, na transmissão da bactéria ao hospedeiro vertebrado. Também foi visto que a via JAK/STAT regula a expressão do peptídeo ISAMP, sugerindo que a via JAK/STAT tem função no controle da infecção por *A. phagocytophilum* mediante a regulação da expressão de PAM (Liu et al., 2012).

Em análises *in silico* realizadas em banco de dados de EST de *R. microplus* foram identificados a maioria dos componentes das vias Toll e JAK/STAT de

artrópodes, evidenciando o alto grau de conservação em carrapatos. No entanto, alguns componentes da via IMD não foram encontrados (Rosa et al., 2016). Foram identificadas 10 dos 12 membros da via Toll de *Drosophila* no transcriptoma de *R. microplus*, com exceção apenas do fator de transcrição Rel/NF-kappa B e sua proteína inibidora, IkappaB Cactus. Entretanto, ortólogos desses genes de *Drosophila* foram identificados em base de dados de sequências de nucleotídeos dos carrapatos *I. ricinus*, *I. scapularis* e *R. pulchellus*. A maioria dos componentes da via JAK/STAT foram encontrados, com exceção do ligante do receptor Domeless. Além disso, cinco dos 18 componentes chaves da via IMD descritos em *Drosophila* não foram encontrados em carrapatos, entre os que se incluem o adaptador IMD, as proteínas associadas FADD, PIRK e Dnr1 e o inibidor Caspar. Em uma análise de RT-qPCR em larga escala, foi evidenciado que os genes associados às vias de sinalização são diferencialmente expressos na linhagem embrionária derivada de *R. microplus*, BME26, em resposta a desafios com microrganismos termoinactivados. O desafio com *Enterobacter cloacae* induziu a expressão da maioria dos genes analisados nas primeiras 6 h e muitos desses genes continuam sendo induzidos ao longo de 72 h. A indução desses genes nas células BME26 estimuladas com *M. luteus* foi vista após 24 h de desafio e em estímulos com *S. cerevisiae*, diversos genes foram induzidos após 6 h e reprimidos após 24 h do desafio. Em infecções com *A. marginale*, uma bactéria transmitida naturalmente por *R. microplus*, foi visto que a os níveis de transcritos da maioria dos genes analisados foram reduzidos, com exceção de oito componentes da via Toll e cinco componentes da via IMD. Em contraste com a inibição de todos os componentes da via JAK/STAT durante os tempos testados. Por outro lado, em infecções por *R. rickettsii*, a maioria dos genes das vias de sinalização foram induzidos após 24 h de infecção. Esses resultados sugerem que as vias de sinalização celular de carrapatos sejam diferencialmente moduladas por patógenos distintos, assim como descrito em *Drosophila* e *Ae. aegypti* (Rosa et al., 2016). Experimentos posteriores do nosso grupo demonstraram que o silenciamento dos fatores de transcrição Dorsal (via Toll), STAT (via JAK/STAT) e Relish (via IMD) em *R. microplus* aumentou o número de *A. marginale* nas glândulas salivares após alimentação em bovinos infectados, evidenciando a importância dessas vias de sinalização no controle da infecção (dados não publicados).

1.2.2.1 Estresse oxidativo

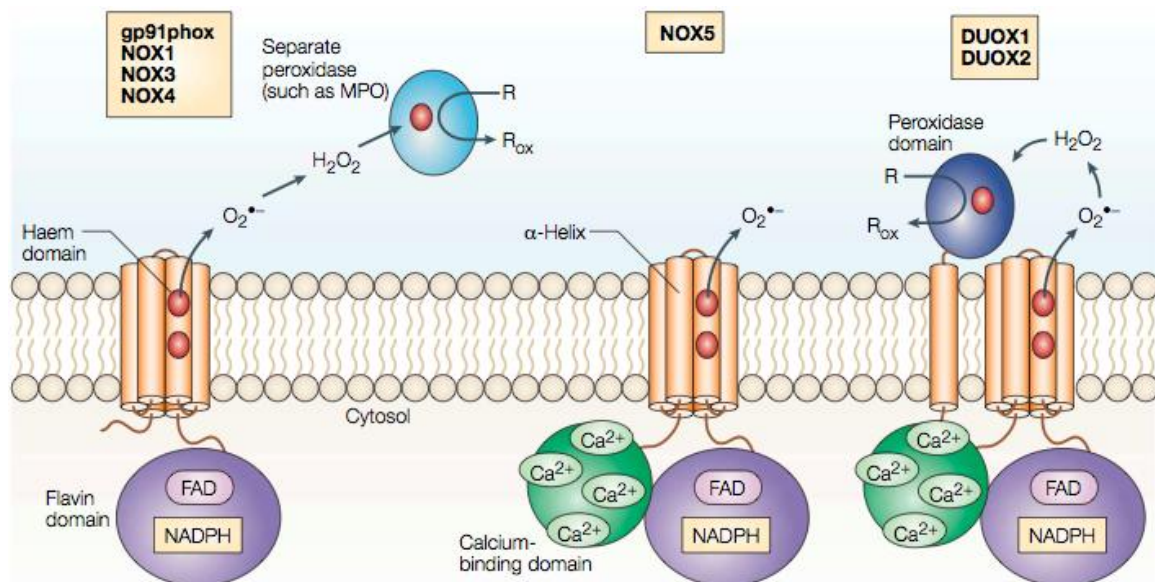
O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes, resultando em um aumento das pró-oxidantes e, conseqüentemente, provocando uma ruptura na sinalização e no controle redox e/ou danos moleculares (Sies, 1999). Apesar dos prejuízos que estas moléculas pró-oxidantes provocam nas células, também fazem parte de um dos principais mecanismos para a eliminação de microrganismos fagocitados. Dentre as ERO podemos citar os radicais livres derivados da redução do oxigênio (O_2) tais como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxil (OH^{\cdot}), peroxil (ROO^{\cdot}) e alcoxil (RO^{\cdot}), e também espécies não radicalares, como o ácido hipocloroso (HOCl) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Embora o O_2 seja fundamental para a obtenção da energia em organismos aeróbicos, é importante ressaltar que os produtos derivados nas reações oxidativas, tais como o radical $O_2^{\cdot-}$, geram um ambiente altamente tóxico para as células (Halliwell, Gutteridge, 2003). Em pH fisiológico, este radical pode sofrer dismutação espontânea ou por ação enzimática, produzindo H_2O_2 . A decomposição do H_2O_2 é mediada pela redução do íon férrico (Fe^{+3}) a íon ferroso (Fe^{+2}) produzindo o radical OH^{\cdot} (Reação de Fenton), o qual é considerado a principal espécie prejudicial para as células (Liochev, Fridovich, 2002).

O processo de redução do O_2 pode ser mediado também por vias enzimáticas. Na reação enzimática estão envolvidas enzimas pertencentes à família das NADPH oxidases (NOX), localizadas na membrana celular dos leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células endoteliais. Da mesma forma, esse processo também pode ser mediado pela atividade da enzima citocromo P450 oxidase, encontrada no retículo endoplasmático e em outras organelas, metaboliza drogas, xenobióticos, ácido araquidônico e retinóico, colesterol e vitamina D (Halliwell, Gutteridge, 2003).

Existem duas classes de enzimas que pertencem à família NOX e fazem parte da resposta imune em artrópodes: (i) as NADPH oxidases, as quais, na redução do O_2 molecular, geram o radical $O_2^{\cdot-}$ e (ii) as DUAL oxidases (DUOX), que geram

H_2O_2 . Os membros da família NOX, GP91PHOX, NOX1, NOX2, NOX3 e NOX4 são enzimas que fazem parte da resposta imune em mamíferos (Sumimoto, 2008), enquanto que a NOX5, que contém um domínio de ligação de cálcio, tem sido estudada como enzima chave na resposta imune em artrópodes (Gonçalves et al., 2012). As enzimas NADPH oxidases possuem um domínio amino-terminal hidrofóbico que contém seis α -hélices transmembranares e cinco resíduos conservados de histidina, os quais proporcionam sítios de ligação a dois grupos heme. Os grupos heme formam um canal na membrana celular que permite a passagem de elétrons, gerando $O_2^{\bullet-}$ na presença de O_2 . Na extremidade carboxi-terminal (citoplasmática) encontram-se sítios de ligação a duas coenzimas: flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que atuam como doadores de elétrons (Figura 2). A produção do radical $O_2^{\bullet-}$ pela atividade da NADPH oxidase, incrementa a concentração de K^+ no fagolisossomo, propiciando o ataque proteolítico do patógeno por enzimas como a elastase e catepsina G, resultando na sua eliminação (Reeves et al., 2002).

Figura 2 - Esquema da estrutura das enzimas da família NOX



A extremidade carboxi-terminal das enzimas da família NOX contém sítios de ligação das coenzimas FAD e NADPH, que doam os elétrons para gerar radical $O_2^{\bullet-}$. No caso das enzimas GP91PHOX, NOX1, NOX3, NOX4, NOX5 e DUOX, há a geração de H_2O_2 . A NOX5 e a DUOX contêm um domínio de ligação de cálcio. O domínio homólogo à peroxidase na extremidade amino-terminal das enzimas DUOX pode oxidar substratos extracelulares. Fonte: Lambeth, 2004.

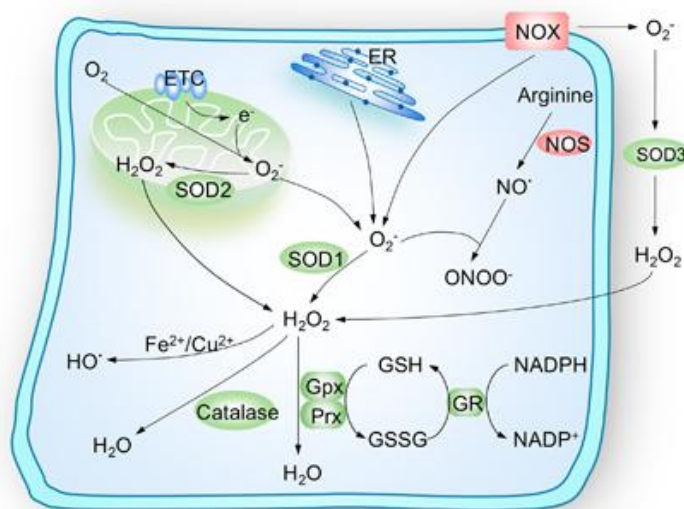
A enzima DUOX é estruturalmente similar à NOX5, no entanto a DUOX tem um domínio homólogo à peroxidase na extremidade amino-terminal e uma α -hélice extra (Figura 2). A sequência de aminoácidos do domínio homólogo à peroxidase da DUOX é similar à da enzima mieloperoxidase (MPO), que é a responsável pela decomposição do H_2O_2 a HOCl. Apesar da similaridade destas duas peroxidases, existe uma substituição em um aminoácido que parece ser crítico para a atividade da MPO. O domínio homólogo à peroxidase da DUOX catalisa a formação de uma rede de proteínas através de ligações ditirosinas em *E. coli* (Edens et al., 2001). A dupla função da DUOX, de geração de ERO e atividade de peroxidase, pode ser utilizada para oxidar um substrato extracelular como as proteínas da matriz extracelular, tendo grande importância em células epiteliais (Lambeth, 2004).

Devido ao caráter altamente tóxico de alguns radicais de O_2 , as células apresentam mecanismos de destoxificação. Essa destoxificação consiste, basicamente, na eliminação dos radicais produzidos. A enzima superóxido dismutase (SOD) dismuta o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e, por sua vez, as enzimas catalase (CAT), peroxirredoxina (PRX) e glutatona peroxidase (GPX) decompõem H_2O_2 em H_2O e O_2 (Figura 3). As PRX são peroxidases tiol-dependentes que contêm uma cisteína peroxidativa conservada que reage com H_2O_2 ou ROOH e forma cisteína ácido sulfênico. Subsequentemente, o ácido sulfênico reage com o grupo tiol de outro monômero, gerando pontes dissulfeto antes de ser reduzido novamente para um grupo tiol livre (Low et al., 2008). Os diferentes mecanismos de regeneração dos grupos tiol permitem a classificação das peroxidases, entre a qual encontra-se a GPX.

A GPX é amplamente distribuída em diferentes tecidos de animais, porém é menos abundante em plantas e em células bacterianas. A GPX catalisa a redução de ROOH na presença da glutatona reduzida (GSH), gerando glutatona oxidada (GSSG), que por sua vez, é regenerada pela glutatona redutase (GR) (Mishra, Imlay, 2013). Na reação, a GR regenera a forma reduzida da glutatona, então o NADPH serve como doador de elétrons, sendo oxidado a $NADP^+$. A glutatona é o tripeptídeo (Y-glutamilcistenilglicina) mais abundante que está envolvido em processos importantes como regulação da expressão gênica, apoptose e

sinalização, e é ainda o indicador ideal de potencial redox em qualquer sistema biológico (Sies, 1999). A GPX também pode interagir com outros peróxidos, catalisando a redução de hidroperóxido de lipídeo (LOOH) e hidroperóxido sintético a álcool (Halliwell, Gutteridge, 2003). Similar a GPX, a enzima glutathiona peroxidase de hidroperóxidos de lipídeos (PHGPX) usa a glutathiona para reduzir LOOH. Cossío-Bayúgar et al. (2005) observaram um aumento na expressão gênica da PHGPX em *R. microplus* em linhagens de carrapatos resistentes a acaricidas quando comparados com as linhagens sensíveis. Dessa forma, a destoxificação feita pela PHGPX parece ser um importante mecanismo de defesa das linhagens resistentes de carrapatos a acaricidas (Cossío-Bayúgar et al., 2005).

Figura 3 - Esquema da produção e destoxificação de ERO e ERN na homeostase das células



Principais fontes de estresse oxidativo celular: cadeia transportadora de elétron (ETC), NADPH oxidase (NOX) e retículo endoplasmático (ER). O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), produto da redução do oxigênio molecular (O_2), pode ser convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) mediante a superóxido dismutase (SOD) ou, em combinação com óxido nítrico (NO^{\bullet}) gera peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). O H_2O_2 na presença de íons ferroso (Fe^{+2}) ou cobre (Cu^{+2}) produz radical hidroxil (HO^{\bullet}). Adicionalmente o H_2O_2 é reduzido à água (H_2O) pela catalase ou glutathiona peroxidase (GPX) e peroxirredoxinas (PRX) na presença da glutathiona reduzida (GSH). Fonte: Wang et al., 2013.

Durante a alimentação dos artrópodes hematófagos, grandes quantidades de heme são liberadas após a digestão da hemoglobina (Jeney et al., 2002). O heme é

um grupo prostético constituído por um átomo de ferro localizado no centro de um anel aromático heterocíclico chamado porfirina. Esse átomo de ferro é liberado, participando na produção de OH^{\bullet} (Liochev, Fridovich, 2002). Devido à característica pró-oxidante do heme, pode haver a geração do estresse oxidativo. Foi demonstrado que a catalase em *R. microplus* tem um papel crítico no equilíbrio da regulação redox no intestino após o repasto sanguíneo, de forma a garantir a sobrevivência do carrapato (Citelli et al., 2007). O silenciamento específico da expressão do gene da catalase por RNAi resultou em um acúmulo de H_2O_2 no epitélio intestinal, provocando um efeito deletério, reduzindo a sobrevivência dos carrapatos. Portanto, a catalase torna-se um alvo interessante para o desenvolvimento de métodos de controle de carrapatos (Citelli et al., 2007).

Outra família de enzimas antioxidantes importantes englobam a GST, que está amplamente distribuída em organismos vertebrados e invertebrados. As enzimas que fazem parte desta família são extremamente diversas nas suas sequências de aminoácidos, e grande parte dessas sequências depositadas em bases de dados públicos apresentam funções desconhecidas (Atkinson, Babbitt, 2009). A GST catalisa a conjugação da GSH a centros eletrofílicos de uma ampla variedade de substratos, tornando os compostos hidrossolúveis para sua eliminação. A atividade desta enzima permite a destoxificação de compostos endógenos como lipídeos peroxidados (Oakley, 2011). A GST também possui outras funções que não estão associadas à destoxificação, como reparo de macromoléculas oxidadas por ERO, degradação de xenobióticos, sinalização da via JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal Kinase*) (Adler et al., 1999), biossíntese de prostaglandinas (Kanaoka et al., 1997) e desenvolvimento de doenças como Parkinson e Alzheimer (no caso de mutações ou ausência de GST específicas) (Sheehan et al., 2001).

Em carrapatos da espécie *R. microplus*, verificou-se que a correlação da atividade de enzimas antioxidantes como a CAT e GST parecem ter um papel importante no desenvolvimento embrionário (Freitas et al., 2007). Adicionalmente, o processo de peroxidação lipídica (fonte de energia) se mantém elevado, podendo levar ao estresse oxidativo. No desenvolvimento embrionário há ainda um aumento no consumo de O_2 devido a alta atividade metabólica. Após a eclosão das larvas, o consumo de O_2 se mantém alto durante os primeiros cinco dias e posteriormente

decai. Com isto, se evidencia o papel que tem o estresse oxidativo durante a embriogênese e envelhecimento (Freitas et al., 2007).

Além das ERO, existem as espécies reativas de nitrogênio (ERN) que são altamente reativas e são geradas como produtos do metabolismo celular sob condições patológicas ou após exposição a xenobióticos. As ERN compreendem o anidrido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$) e são produzidas pelo metabolismo do óxido nítrico (NO^*). O NO^* é uma molécula hidrofóbica que se difunde livremente através das membranas e é gerado pela óxido nítrico sintase (NOS), que faz parte de um grupo de enzimas localizadas no citosol ou na membrana e medeiam a oxidação da L-arginina a L-citrulina e NO^* (Figura 3) (Rodriguez-Ramos et al., 2010).

No início da década de 90, a NOS foi encontrada no cérebro de diversos insetos e foi visto que compartilha características com a NOS de vertebrados. O NO^* gerado está envolvido na indução da resposta imune celular e humoral em insetos, assim como na sinalização, processamento da informação visual e formação de memória a longo prazo (Muller, 1997; Nappi et al., 2000).

Os produtos da oxidação do NO^* podem interagir com as ERO. Tal é o caso do cloreto de nitrila (NO_2Cl) que é considerado agente oxidante, nitrante e clorinante em sistemas *in vitro*. O $ONOO^-$ produzido devido à reação do NO^* com O_2 , ou mais frequentemente com o radical $O_2^{\cdot-}$, atravessa as membranas por canais aniônicos e por difusão passiva na sua forma protonada, ácido peroxinitroso ($ONOOH$). O $ONOO^-$ é de grande importância em sistemas biológicos, estando envolvido na oxidação e nitração de lipídeos, quebra do DNA, nitração e desaminação de bases, nitração de resíduos de aminoácidos aromáticos e oxidação de cisteína, metionina e outros resíduos (Halliwell, Gutteridge, 2003).

A nitração é considerada uma modificação pós-traducional de grande importância devido à capacidade de alterar funções proteicas e desencadear doenças agudas e crônicas. A nitração da tirosina é mediada por $ONOO^-$ e dióxido de nitrogênio (NO_2^*) na presença de oxidantes como $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Da mesma forma, a liberação de metais de transição das proteínas causadas pela oxidação por radical $O_2^{\cdot-}$, em conjunto com ação de heme peroxidases, resulta na formação de $-NO_2$.

Diversas proteínas mitocondriais são nitradas *in vitro* e *in vivo*, como por exemplo a MnSOD, aconitase (catalisa a estereoisomerização de citrato a isocitrato), citocromo c e ATPase. A MnSOD é nitrada pelo ONOO⁻ no resíduo Tyr-34 do seu sitio ativo, promovendo a perda de atividade enzimática. Esta inativação da MnSOD opera como um indutor da formação de ONOO⁻ na mitocôndria, que por sua vez, desencadeia a sinalização pró-apoptótica na célula (Radi et al, 2002; Radi, 2004). Proteínas mitocôndrias nitradas e citocromo c nitrado no citosol servem como marcadores de estresse oxidativo mitocondrial dependente de NO[•].

1.2.2.1.1 influência do estresse oxidativo na microbiota intestinal de artrópodes

O intestino dos artrópodes é o órgão que está exposto a uma maior diversidade de microrganismos. As comunidades de microrganismos encontradas neste órgão induzem a uma resposta imune que medeia as interações entre a microbiota e o artrópode, contribuindo com a manutenção da homeostasia do mesmo. A quebra da homeostasia no epitélio intestinal pode ser provocada pelo desequilíbrio metabólico, assim como pelo aumento do estresse oxidativo (Buchon et al., 2009).

Considerando os efeitos dos radicais livres gerados pelo grupo heme, os artrópodes hematófagos desenvolveram estratégias para minimizar as consequências que levariam à alteração da microbiota normal do intestino. Uma das estratégias para reduzir o prejuízo causado pelo grupo heme proveniente da refeição sanguínea foi mostrada em *Ae. aegypti*. *Ae. aegypti* reduz a produção de ERO após o repasto sanguíneo, levando a formação de um ambiente favorável para a proliferação da microbiota no intestino do mosquito. Este aumento da microbiota no intestino também foi verificado quando foi silenciado o gene da *DUOX* em *Ae. aegypti*, mostrando uma diminuição de aproximadamente 40% das ERO. No entanto, a diminuição de ERO no intestino resulta na redução da resistência do mosquito à presença de *E. asburiae* e aumento na mortalidade (Oliveira et al., 2011). Em *Drosophila*, foi verificado um aumento na proliferação de bactérias patogênicas no intestino de moscas que não expressam a enzima *DUOX* e, conseqüentemente, houve um aumento da taxa de mortalidade. Esse resultado demonstrou que a *DUOX*

intestinal é a responsável pela geração de um ambiente pró-oxidante requerido para o controle da proliferação de microrganismos patogênicos presentes na microbiota (Ha et al., 2005; Ha et al., 2009).

Além da participação direta na atividade antimicrobiana, a DUOX tem uma ação em conjunto com uma peroxidase imunomodulatória (IMPer), como verificado em *Anopheles gambiae* (Kumar et al., 2010). No intestino deste mosquito, o sistema IMPer/DUOX catalisa a formação de uma rede de proteínas através das ligações ditirosinas. Essa rede proteica impede que componentes bacterianos tais como PGN e LPS, cheguem até o epitélio intestinal e ativem a resposta imune do vetor contra microrganismos (patógenos e/ou microbiota intestinal). O sistema IMPer/DUOX confere portanto a uma proteção para *A. gambiae*, pois evita a ativação crônica do sistema imune, que poderiam ser prejudiciais tanto à microbiota intestinal quanto ao próprio mosquito. Além disso, demonstrou-se que o silenciamento dos genes da DUOX ou IMPer por RNAi leva a uma redução no número de oocistos de *P. falciparum* (Kumar et al., 2010).

A microbiota do intestino do vetor pode alterar sua capacidade vetorial. Em *A. arabiensis*, um dos vetores da malária na Zâmbia, bactérias como *Pseudomonas putida*, *Bacillus pumilus* e *Enterobacter* spp. fazem parte da microbiota normal do intestino. No entanto, somente *Enterobacter* (cepa Esp_Z) tem a capacidade de inibir o desenvolvimento do ciclo de uma cepa altamente virulenta de *Plasmodium* mediante à indução da produção de ERO pelo mosquito (Cirimotich et al., 2011).

O envolvimento das enzimas antioxidantes como a CAT e a SOD na viabilidade da microbiota foi demonstrada em *A. aquasalis* infectado por *P. vivax*. No intestino do vetor, verificou-se que a atividade da CAT e da SOD é significativamente reduzida 24 h após a infecção por *P. vivax*. Com o silenciamento da CAT por RNAi, o número de oocistos de *P. vivax* no intestino aumenta, enquanto a microbiota natural do vetor diminui. Sugere-se, portanto, que a redução da atividade da CAT em *A. aquasalis* pode ser consequência da manipulação do parasita para aumentar as ERO e, conseqüentemente, reduzir a microbiota natural do intestino para o seu desenvolvimento dentro do vetor (Bahia et al., 2013).

1.4 Interações moleculares entre carrapatos e patógenos

O sucesso na sobrevivência, multiplicação e disseminação dos patógenos para a manutenção da infecção nos hospedeiros vertebrados dependem de diversos mecanismos. Estes mecanismos incluem a expressão de proteínas na superfície do patógeno para interação com o hospedeiro vertebrado e invertebrado e a modulação da resposta imune do vetor e do humano, dentre outros. A seguir, serão apresentados alguns exemplos da interação dos patógenos transmitidos pelos carrapatos importantes do ponto de vista médico e veterinário.

1.4.1 *B. burgdorferi* e *I. scapularis*

A doença de Lyme é uma doença causada pelas espiroquetas *B. garinii*, *B. afzelii* encontradas na Europa e Ásia e *B. burgdorferi* encontrada nos Estados Unidos. No nordeste dos Estados Unidos, *B. burgdorferi* sobrevive em um ciclo enzoótico envolvendo três espécies de carrapato do gênero *Ixodes*, pequenos roedores, aves e lagartos (Steere et al., 2004). A borreliose em humanos é sistêmica, se iniciando como uma erupção cutânea na área da picada do carrapato e o tratamento com antibióticos é efetivo nessa fase da infecção. Quando a doença não é tratada, as espiroquetas se disseminam pelo corpo provocando patologias associadas à artrite (*B. burgdorferi*), a sintomas neurológicos (*B. garinii*) ou a dermatite (*B. afzelii*) (Stanek et al., 2011).

B. burgdorferi possui uma proteína de superfície chamada OspA, que é predominantemente expressa no intestino de *I. scapularis* e medeia os processos de adesão e replicação do patógeno (De Silva et al., 1996). Esta espiroqueta também possui outra molécula de superfície chamada OspC e está envolvida nos processos de invasão nas glândulas salivares e transmissão ao hospedeiro mamífero. O receptor TROSPA, especificamente expresso nas células do intestino do carrapato, foi implicado no reconhecimento da proteína OspA (Pal et al., 2004). A redução deste receptor, diminui a aderência de *B. burgdorferi* no intestino do carrapato que, conseqüentemente, reduz a transmissão do patógeno.

Assim como *B. burgdorferi* expressa proteínas de superfície para sua persistência em diferentes tecidos do vetor, *I. scapularis* produz uma proteína que beneficia a colonização da bactéria. Esta proteína denominada SALP25D foi identificada nas glândulas salivares do carrapato. A SALP25D é uma proteína homóloga à GPX, cuja expressão é induzida durante a alimentação. Além disso, o silenciamento deste gene por RNAi afetou a colonização das células do intestino pela bactéria (Das et al., 2001). A proteína SALP25D reduz as ERO produzidas por neutrófilos ativados por PMA (do inglês, *phorbol 12-myristate 13-acetate*), funcionando, portanto, como um antioxidante e permitindo a sobrevivência de *B. burgdorferi* (Das et al., 2001). Outra proteína secretada na saliva de *I. scapularis* e *I. ricinus* é a SALP15 que protege a cepas de *Borrelia* spp sensíveis ao soro, contra a resposta mediada por complemento em vertebrados. Esta proteína protege as espiroquetas da formação do complexo de ataque a membrana, conformado pelos componentes C5d, C6, C7, C8 e C9 da via complemento. Quando as espiroquetas são incubadas com s SALP15 recombinante, o depósito dos componente C5b-C9 é reduzido em um 75% em relação ao controle, espiroquetas incubadas com BSA. Este efeito de proteção contra o sistema complemento é crucial na infecção inicial no hospedeiro vertebrado (Schuijt et al., 2008). Adicionalmente, *I. scapularis* possui um receptor chamado Tre31 que interage com a lipoproteína BBE31 localizada na superfície de *B. burgdorferi*, facilitando a multiplicação do patógeno na hemolinfa e nas glândulas salivares do carrapato (Zhang et al., 2011).

1.4.2 A. phagocytophilum, Ehrlichia chaffeensis e Ixodes sp

A anaplasmoze granulocítica humana é considerada uma doença infecciosa emergente causada por *A. phagocytophilum* e transmitida por *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. ricinus* e *I. persulcatus*. Esta bactéria tem sido bastante estudada após o aparecimento do primeiro caso de anaplasmoze granulocítica humana no nordeste dos Estados Unidos, onde tanto o patógeno quanto o vetor que o transmite são altamente prevalentes (Maeda et al., 1987). Os principais sintomas dessa doença incluem: febre, mialgias, calafrios, leucopenia, trombocitopenia e/ou anemia e podem ser apresentados duas ou três semanas após a picada do carrapato. Apesar

da transmissão biológica ser a forma principal de infecção por *A. phagocytophilum*, o humano pode ser infectado mediante transmissão nosocomial e/ou perinatal. Esta bactéria invade e se multiplica nos vacúolos parasitóforos dos granulócitos (Aguero-Rosenfeld et al., 1996).

Assim como *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* modula alguns genes do carrapato para sua sobrevivência. *A. phagocytophilum* induz a expressão do gene da *SALP16* nas glândulas salivares de *I. scapularis* durante a alimentação. O silenciamento desse gene por RNAi ocasiona uma redução de mais de 90% das bactérias nas glândulas salivares, mas não no intestino. Esses resultados indicam que a *SALP16* não é requerida para a colonização do intestino pelas bactérias, mas é indispensável para a sua multiplicação nas glândulas salivares, facilitando, dessa forma, a sua transmissão para o hospedeiro vertebrado (Sukumaran et al., 2006).

Pouco é conhecido sobre o envolvimento da fucose em artrópodes. No entanto, estudos sugerem a importância dessa molécula na colonização dos patógenos em carrapatos. A fucosilação resulta da adição de resíduos de fucose em glicoproteínas ou glicolípídeos e está relacionada com importantes processos como organogênese, inflamação, câncer, adesão celular e patogênese microbiana (Ma et al., 2006). Em *I. scapularis* foi demonstrada a presença de proteínas contendo resíduos de α 1,3-fucose nas glândulas salivares e no intestino. Além disso, foi demonstrado que *A. phagocytophilum* modula a expressão de três α 1,3-fucosiltransferase (*ISFT1*, *ISFT2* e *ISFT3*), as quais estão envolvidas no processo de fucosilação do vetor. O silenciamento gênico de uma região conservada das três α 1,3-fucosiltransferase em experimentos de RNAi, promoveu uma redução no número de bactérias nas glândulas salivares durante a aquisição. No entanto, o silenciamento não afetou a transmissão da bactéria para hospedeiro vertebrado. Assim, (i) a inibição da interação da α 1,3-fucosilação e *A. phagocytophilum* em carrapatos, (ii) a inibição de α 1,3-fucosiltransferases e (iii) o desenvolvimento de vacinação contra proteínas α 1,3-glicosiladas, são atributos importantes a serem considerados para o desenvolvimento de tratamentos contra *A. phagocytophilum* (Pedra et al., 2010).

A. phagocytophilum também modula um gene que facilita a migração da bactéria do intestino para as glândulas salivares de *I. scapularis*. O gene que codifica a proteína P11 é expresso nas glândulas salivares e nos hemócitos do

carrapato. Com o silenciamento do gene da P11, a aquisição da bactéria foi prejudicada, visto a diminuição da carga bacteriana nas glândulas salivares e na hemolinfa após a alimentação. Por outro lado, anticorpos contra a proteína recombinante P11 (rP11) afetam a migração da bactéria do intestino para as glândulas salivares do carrapato. Para isso, os anticorpos rP11 foram injetados nos carrapatos e posteriormente, os carrapatos se alimentaram em camundongos infectados por *A. phagocytophilum*, mostrando uma diminuição da bactéria na hemocele e nas glândulas salivares, sem afetar a infecção no intestino (Liu et al., 2011).

Em neutrófilos humanos, a infecção por *A. phagocytophilum* modula a maquinaria natural do processo de apoptose, inibindo a liberação de fatores pró-apoptóticos e a ativação da via das caspases (Ge et al., 2005). Esta bactéria também usa como estratégia a sua capacidade de subverter processos autofágicos das células hospedeiras, bloqueando o processo de fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos (Niu et al., 2006). Bactérias como *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum*, a inibição da produção de radical $O_2^{\cdot-}$ intracelular e extracelular é usada como estratégia para sobrevivência e estabelecimento da infecção em monócitos humanos. Foi demonstrado em ensaios *in vitro* que macrófagos pré-tratados com paraquat ou H_2O_2 , essas duas bactérias diminuem sua habilidade para infectar o hospedeiro. Por outro lado, *E. chaffeensis* é capaz de inibir a produção de radical $O_2^{\cdot-}$ em macrófagos estimulados com PMA mediante a inibição do transcrito do gene *P22PHOX* que por sua vez, é inibido por ação de proteases derivadas tanto da membrana celular do hospedeiro como da própria bactéria (Lin, Rikihisa, 2007). Em *A. phagocytophilum*, foi demonstrado que a bactéria induz o aumento no consumo de O_2 ao infectar células da linhagem humana HL-60, reprimindo-o posteriormente para evitar o processo de apoptose e sobreviver intracelularmente (Choi et al., 2005). Além disso, evidências apontam que durante o processo infectivo, os transcritos dos genes *GP91PHOX* e *GP22PHOX* são degradados (Banerjee et al., 2000; Mott et al., 2002).

1.4.3 *R. rickettsii* e *A. aureolatum*

A Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, conhecida no Brasil como Febre Maculosa Brasileira, é uma doença causada pela bactéria *R. rickettsii* que está distribuída unicamente no continente americano. Esta doença que acomete ao homem, pode apresentar altas taxas de letalidade e no Brasil podem chegar a 40% estando associada à falta de tratamento com antibióticos específicos (Dantas-Torres, 2007). O período de incubação dessa doença varia de seis a oito dias após a picada do carrapato, sendo os principais sintomas febre, cefaleia e mialgia intensa seguida de prostração. Na América Central e na América do Sul, a bactéria é transmitida pelo carrapato *A. cajennense* e no Brasil também por *A. aureolatum* (Chapman et al, 2006).

Diversos genes de *R. rickettsii* são modulados durante a alimentação do carrapato. Genes associados à secreção como os componentes do sistema de secreção do tipo IV (T4SS) foram induzidos durante a alimentação (Galletti et al., 2013). O T4SS é um complexo de macromoléculas especializadas que medeiam a liberação de moléculas e está relacionado com o sistema de conjugação bacteriano. Bactérias intracelulares utilizam este sistema para secretar DNA ou proteínas dentro de células eucariotas, as quais desempenham diversas atividades importantes relacionadas com a replicação e modulação da resposta imune (Voth et al., 2012).

Além da indução de alguns dos componentes do T4SS, foi observada a indução de genes envolvidos na destoxificação de ERO. Os genes antioxidantes induzidos foram *tioredoxina peroxidase 1*, *glutaredoxina 3* e *ferredoxina*, sugerindo que *R. rickettsii* usa essas enzimas para se proteger da reposta oxidativa produzida no carrapato alimentado (Galletti et al., 2013).

1.4.4 *Babesia* sp, *H. longicornis* e *Rhipicephalus* sp

A babesiose é uma doença causada por protozoários do gênero *Babesia* sp. Essa doença junto com a anaplasnose, causada por *A. marginale*, constitui o

complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB). A transmissão é dada pelo carrapato *H. longicornis* e espécies do gênero *Rhipicephalus*. Apesar da TPB ser causada por dois agentes etiológicos diferentes, os sinais clínicos e epidemiológicos são similares e incluem hipertermia, anemia, hemoglobinúria, icterícia, anorexia, hemaciação e alta morbidade em bovinos (Homer et al., 2000).

Uma das moléculas identificadas sendo diferencialmente expressa pela infecção por *B. microti* no carrapato *H. longicornis* é a longicina. A longicina é uma defensina-like com atividade antimicrobiana e antifúngica. O tratamento de babesias com longicina recombinante inibe a proliferação *in vitro* de *B. equi* e reduz a parasitemia em camundongos infectados por *B. microti* (Tsuji, Fujisaki, 2007). Além disso, o silenciamento do gene da longicina por RNAi leva ao aumento do número de *B. gibsoni* em órgãos como intestino, ovários e ovos, indicando o possível papel da proteína na capacidade vectorial do carrapato (Tsuji, Fujisaki, 2007). Outra molécula com expressão diferencial é a longipaina. A longipaina é uma cisteína protease, específica do intestino de *H. longicornis*, que é induzida durante o repasto sanguíneo. Da mesma forma que a longicina, a longipaina recombinante inibe a proliferação *in vitro* de *B. equi* e o silenciamento desse gene no carrapato aumenta a carga parasitária no lúmen do intestino, ovário e larvas (Tsuji et al., 2008). A cistatina-2 é um inibidor de serina-proteases que é altamente induzido no intestino e nos hemócitos de *H. longicornis* após a infecção por *Babesia*. A cistatina-2 recombinante teve um leve efeito *in vitro* no crescimento de *B. bovis*, porém seu papel na infecção *in vivo* ainda não foi avaliado (Zhou et al., 2006). Da mesma forma, receptores como o TROSPA e a proteína amiloide sérica A, envolvida na resposta do hospedeiro à inflamação e lesão de tecidos em *R. annulatus*, são modulados na infecção por *B. bigemina* (Antunes et al., 2012).

1.4.5 Anaplasma marginale, D. variabilis e R. microplus

Sistemas de cultivo *in vitro*, principalmente os de linhagens celulares contínuas, foram desenvolvidos a partir de tecidos de hospedeiros e vetores, os quais tem contribuído de maneira significativa para o conhecimento sobre a biologia dos

parasitas e a interação hospedeiro-vetor-patógeno. Além disso, as linhagens celulares vêm possibilitando a produção de antígenos para a utilização em testes de diagnósticos e para o desenvolvimento de vacinas (Bell-Sakyi et al., 2007; Blouin et al., 1998). Os sistemas de cultivo *in vitro* mais usados para o estudo de *A. marginale* são derivados de células do carrapato *I. scapularis*, denominados IDE8 e ISE6 (Munderloh et al., 1996) e do carrapato *R. microplus*, denominada BME26 (Esteves et al., 2008; Esteves et al., 2009).

As proteínas da superfície de *A. marginale*, denominadas MSPs (do inglês, *major surface protein*), são as responsáveis pelo mecanismo de reconhecimento por parte dos receptores celulares de eritrócitos e carrapatos e posteriormente de adesão. Foram identificadas seis MSPs em *A. marginale* (MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5), cuja funcionalidade foi demonstrada a partir da expressão heteróloga de algumas dessas proteínas. As proteínas MSP1a e MSP1b fazem parte do complexo MSP1. A proteína MSP1a está envolvida na adesão aos eritrócitos bovinos e às células do carrapato, interferindo na transmissão de *A. marginale* por carrapatos do gênero *Dermacentor* spp. A proteína MSP1b atua como adesina em eritrócitos, porém ainda não se demonstrou a funcionalidade em células de carrapato. As proteínas MSP2 e MSP3 estão envolvidas na indução da resposta imune do bovino na infecção por *A. marginale*. As proteínas MSP4 e MSP5 são codificados por genes de cópia única e se desconhece a função destas proteínas. No entanto, a proteína MSP5 tem sido usada como antígeno para imunodiagnóstico, atualmente comercializados em Estados Unidos (de La Fuente et al., 2008; Kocan et al., 2003). Adicionalmente, as MSPs são candidatas a vacinas. A imunização de bovinos com MSP1 e MSP4 conferiu proteção após o desafio com *A. marginale*. A imunização de bovinos com a MSP2 conferiu proteção contra diferentes cepas de *A. marginale* nos Estados Unidos, retardando o início da riquetsemia ou eliminando completamente a infecção (Palmer et al., 1988). Esse atraso na riquetsemia foi observada também em bovinos imunizados com a MSP3, enquanto que a MSP5 não conferiu proteção contra a infecção por *A. marginale* (Palmer, McElwain, 1995).

Estudos mostram que a modulação de genes do vetor por parte de *A. marginale* é uma estratégia que o patógeno utiliza para a invasão e posterior sobrevivência no hospedeiro invertebrado. Resultados obtidos no carrapato *D.*

variabilis mostraram que durante a infecção inicial por *A. marginale* nas células do intestino os genes da *GST*, *vATPase*, *ubiquitina* e *selenoproteína M (SeIM)* são modulados. Também o gene da *GST* poderia estar envolvido na infecção e multiplicação do patógeno nas glândulas salivares. Em carrapatos com a expressão da *GST* reduzida por RNAi, a quantidade de bactérias nas glândulas salivares após a alimentação foi diminuída. Da mesma forma quando o gene da *vATPase* (envolvida na geração do gradiente de prótons na membrana vacuolar) foi silenciado, a infecção pela bactéria diminui no intestino. Porém, ainda assim os patógenos são capazes de infectar e se multiplicar nas glândulas salivares. Quando o gene da *ubiquitina* é silenciado, a infecção por *A. marginale* no intestino é reduzida, enquanto que o silenciamento da *SeIM* resulta na redução da infecção por *A. marginale* nas glândulas salivares, mostrando que o tráfego de *A. marginale* através dos diferentes tecidos é mediada pela expressão gênica do vetor. As *SeIM* são proteínas que contêm seleno-cisteínas e estão envolvidas na proteção contra a resposta oxidativa das células hospedeiras. Adicionalmente, em ensaios realizados com a linhagem celular IDE8, a redução dos transcritos da *SeIM*, *W2a* e da proteína de células *hematopoietic stem/progenitor like* (envolvida na diferenciação celular) por RNAi promoveram a multiplicação de *A. marginale*, sugerindo a participação desses dois genes na resposta celular no controle da proliferação do patógeno (de la Fuente et al., 2007).

O gene citocromo c oxidase (COXIII) de *R. microplus* tem um papel importante na transmissão de *A. marginale* para o bovino, uma vez que a inibição desse gene por RNAi em carrapatos infectados por *A. marginale*, bloqueia a transmissão do patógeno (Bifano et al., 2014). O COXIII codifica uma enzima que faz parte da cadeia transportadora de elétrons. Esta enzima transporta elétrons ao acceptor final, o O_2 , que gera um bombeamento de prótons para a região intermembranar produzindo ATP. O mecanismo de ação do gene COXIII na transmissão ainda é desconhecido. No entanto, se sugere que o silenciamento do gene interfere na liberação do patógeno na saliva do carrapato ou na viabilidade de *A. marginale* na saliva (Bifano et al., 2014).

1.4.5.1 Implicação do estresse oxidativo no controle da infecção por *A. marginale*

Vários trabalhos na literatura tem mostrado a importância do estresse oxidativo no controle da flora intestinal e/ou de patógenos em *Drosophila* e em mosquitos (Ha et al., 2005; Ha et al., 2009; Molina-Cruz et al., 2008; Oliveira et al., 2011). No entanto, pouco ainda é conhecido sobre a implicação desses mecanismos no controle de infecções por *A. marginale* em seu vetor natural.

Nosso grupo de pesquisa, com o intuito de investigar os mecanismos de infecção de *A. marginale* em *R. microplus*, realizou um estudo proteômico comparativo de células embrionárias BME26 infectadas ou não com essa bactéria. A identificação proteica mediante a técnica nano-LC-MS/MS bidimensional, mostrou 202 proteínas diferencialmente reguladas, sendo que 78 foram induzidas e 124 foram reprimidas em 24 h após a infecção por *A. marginale*. Dentre as proteínas relacionadas a estresse oxidativo detectou-se 9 com a expressão aumentada e 11 com a expressão reduzida (dados não publicados). Esses resultados sugeriram o envolvimento dos processos de estresse oxidativo nas interações entre *A. marginale* e o seu vetor natural, o carrapato *R. microplus*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Com base nos dados da literatura e nos dados preliminares do nosso grupo de pesquisa, o objetivo geral deste estudo foi caracterizar o estresse oxidativo das células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus microplus* (BME26) em resposta à infecção por *A. marginale*.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o estabelecimento do processo de invasão de *A. marginale* nas células BME26;
- Avaliar a modulação de alguns genes codificadores de proteínas que estão envolvidas na produção e destoxificação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio;
- Analisar a importância dos genes antioxidantes *RmCAT*, *RmGPX*, *RmTRX* e *RmOXR1* no processo de infecção de *A. marginale*;
- Quantificar a produção de peróxido de hidrogênio em resposta à infecção por *A. marginale*;
- Medir a atividade peroxidase e catalase em resposta à infecção por *A. marginale*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

3.1.1 Células embrionárias

As células embrionárias BME26 e ISE6, isoladas de *R. microplus* (Esteves et al., 2008) e *I. scapularis* (Munderloh et al., 1999), respectivamente, foram cultivadas em garrafas contendo meio L-15B300 suplementado com 5% de soro fetal bovino termo-inativado, 10% de caldo fosfato triptose, 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 0,1% de lipoproteína bovina (pH 7,2). As células foram mantidas a 34 °C na ausência de CO₂ como descrito por Esteves et al. (2008). A viabilidade celular foi determinada por microscopia óptica através da coloração com 4% de azul de tripano (Sigma-Aldrich., St Louis, MO., EUA) e contagem em câmara de Neubauer.

3.1.2 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram: *Micrococcus luteus* ATCC 9341A (bactéria Gram-positiva); *Enterobacter cloacae* K12 (bactéria Gram-negativa), cedida pelo Dr. Hans G. Boman (Universidade de Estocolmo - Suécia); *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 208353); *Rickettsia rickettsii* (cepa Taiaçú) (Pinter, Labruna, 2006); *Anaplasma marginale* (cepa Jaboticabal) (De Andrade et al., 2004) e *A. marginale* GFP (cepa *St. Maries*) (Felsheim et al., 2010).

3.1.2.1 Quantificação de *A. marginale* e *R. rickettsii* por qPCR

O número das riquetsias *A. marginale* e *R. rickettsii* nos cultivos celulares foi determinado por qPCR utilizando as sondas *TaqMan* específicas para os genes de copia única *AmMSP5* ou citrato sintase (*RrGLTA*), respectivamente (Tabela 1), e

uma curva-padrão com diferentes números de cópias do plasmídeo contendo a sequência codificadora de cada gene. Em uma placa de 96 poços, foi feita a mistura de reação em um volume final de 15 µL, contendo 7,5 µL do *TaqMan PreAmp Master Mix 2X* (*Applied Biosystems.*, São Paulo, SP., Brasil), 2 µL da mistura de cada par de oligonucleotídeos (0,6 µM), 0,02 µL da sonda específica para cada bactéria, 3,48 µL de H₂O tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato) e 2 µL de cada amostra de DNA genômico. A placa foi vedada, centrifugada a 1.000 x *g* por 2 min a 4 °C e transferida para um termociclador StepOnePlus (*Applied Biosystems*) usando o programa térmico descrito no item 3.7.2.1.

3.1.2.2 Preparação de inóculo de microrganismos termo-inativados

M. luteus e *E. cloacae* K12 foram cultivados em meio Luria-Bertani (LB) a 37 °C e *S. cerevisiae* ATCC 208353 foi cultivado a 30 °C em meio YPD (do inglês, *Yeast peptone-dextrose*). Após cada microrganismo atingir a densidade óptica de 0,6, foram lavados duas vezes em PBS 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, pH 7,4) e termo-inativados durante 60 min a 75 °C. Foram utilizados inóculos de *M. luteus* e *E. cloacae* contendo 1,25x10⁸ bactérias ou 7x10⁶ leveduras para o inóculo de *S. cerevisiae*.

3.1.2.3 Preparação do inóculo de *R. rickettsii* em células BME26

Uma monocamada com aproximadamente 1x10⁶ células BME26 em garrafas de 12,5 cm² foi incubada a 34 °C em meio L-15B300 sem antibiótico pH 7,5 (Esteves et al., 2008). Após 24 h, as células foram infectadas com um inóculo criopreservado de *R. rickettsii* em células BME26 (gentilmente cedido pela Profa. Andréa Fogaça, Depto. de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo) contendo 3x10⁶ bactérias. Transcorridas 60 h a 34 °C, a monocamada foi removida e centrifugada a 3.000 x *g* por 10 min. O sedimento resultante foi ressuspensionado em meio de congelamento (10% de dimetilsulfóxido (*Thermo*

Scientific., São Paulo, SP., Brasil), 30% de soro fetal bovino (Vitrocell., Campinas, SP., Brasil) e 60% de meio de infecção L-15B300), seguido da contagem celular (item 3.1.1) e quantificação do número de bactérias (item 3.1.2.1). O inóculo foi transferido para tubos criogênicos para armazenamento em tanques de nitrogênio (N₂) líquido. Para os experimentos, o inóculo obtido como anteriormente descrito foi descongelado em banho úmido a 37 °C e utilizado na infecção de células BME26.

3.1.2.4 Preparação do inóculo de *A. marginale*

3.1.2.4.1 Em sangue bovino

O inóculo de *A. marginale* (cepa Jaboticabal) foi obtido de sangue de bovino infectado e preparado seguindo o protocolo de Stevens et al. (2007). Os inóculos criopreservados contendo o sangue infectado, foram descongelados em banho úmido a 37 °C e o conteúdo foi transferido para tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL e centrifugados a 3.000 x *g* por 10 min a 4 °C. O sedimento foi lavado duas vezes em 1 mL de PBS 1X a 3.000 x *g* por 10 min a 4 °C. O sedimento final contendo as bactérias e restos celulares foi suspenso em 750 µL de PBS 1X e utilizado como inóculo para infecção de células BME26 e/ou ISE6.

3.1.2.4.2 Em células ISE6

Uma monocamada com aproximadamente 1×10^7 células ISE6 em garrafas de 75 cm² foi incubada a 34 °C em meio L-15B300 sem antibiótico pH 7,5 (Esteves et al., 2008). Após 24 h, as células foram infectadas utilizando o inóculo de *A. marginale* em sangue bovino (item 3.1.2.4.1) ou *A. marginale GFP* e incubadas a 34 °C. As células ISE6 infectadas foram mantidas com uma troca semanal de meio. Transcorridos 12 dias de infecção, o meio de cultivo foi descartado e a monocamada celular foi lavada com PBS 1X e descolada usando Tripsina/EDTA (Vitrocell). O

conteúdo foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado a 3.000 x *g* por 10 min a 4 °C. O sedimento resultante foi ressuspenso em meio de congelamento (item 3.1.2.3), seguido da contagem celular (item 3.1.1) e quantificação do número de bactérias (item 3.1.2.1). O inóculo foi transferido para tubos criogênicos para armazenamento em tanques de N₂ líquido.

O inóculo obtido como descrito acima foi descongelado em banho úmido a 37 °C e o conteúdo transferido para tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL e centrifugados a 3.000 x *g* por 10 min a 4 °C. O sedimento resultante foi ressuspenso em meio L-15B300 sem antibióticos e transferido para um tubo Falcon de 15 mL. A suspensão de células foi submetida a choque térmico para lise e liberação das bactérias, envolvendo processos rápidos de congelamento em N₂ líquido seguido de descongelamento a 37 °C. Esse procedimento foi realizado três vezes consecutivas para garantir a lise da maioria das células. Após o choque térmico, a suspensão contendo bactérias e restos celulares foi transferida para um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL e centrifugada a 500 x *g* por 5 min a 4 °C. O sobrenadante contendo *A. marginale* foi usado como inóculo para infecção de células BME26.

3.2 Extração de RNA, DNA e síntese do cDNA

O RNA das células foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen., São Paulo, SP., Brasil), de acordo com as orientações do fabricante. O RNA obtido foi tratado com DNase (Invitrogen) e, em seguida, precipitado com acetato de sódio 3 M pH 5,2 e isopropanol (Sigma-Aldrich., St Louis, MO., EUA) (1:1, v/v). A quantificação do RNA foi determinada em NanoDrop (ND-1000) (*Thermo Scientific*) e a sua integridade foi analisada em gel de agarose a 0,8%. Para a síntese de cDNA foram utilizados de 100 a 3.000 ng de RNA total utilizando a enzima SuperScriptIII™ (*Life Technologies.*, São Paulo, SP., Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico (DNAg) foi extraído usando o *mini kit Invisorb Spin Tissue* (*Stratec molecular.*, Birkenfeld, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de DNAg nas amostras também foi determinada em NanoDrop.

3.3 Tratamento das células BME26 com os microrganismos

Uma monocamada com aproximadamente 1×10^6 células BME26 em garrafas de 25 cm^2 foi incubada a $34 \text{ }^\circ\text{C}$ em meio de infecção L-15B300 sem antibiótico, pH 7,5. Após 24 h, o meio de cultivo foi descartado e substituído por meio de cultura com os diferentes inóculos descritos no item 3.1.2. Transcorridos os tempos determinados de incubação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$ para cada experimento, o sobrenadante foi descartado e a monocamada celular foi lavada com PBS 1X, seguido da descolagem mecânica com rodo de células ou química com Tripsina/EDTA (Vitrocell). O sobrenadante foi centrifugado a $3.000 \times g$, durante 10 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e o sedimento usado para a determinação do número de bactérias, análise da expressão gênica, dosagem de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou da atividade de catalase ou peroxidase.

3.4 Cinética de crescimento de *A. marginale* nas células BME26

A determinação da cinética de crescimento de *A. marginale* nas células BME26 após 1, 3, 7, 14 e 21 dias de infecção foi realizada por qPCR. Para isso, foi realizada uma infecção de $4,8 \times 10^6$ células BME26 em garrafas de 25 cm^2 utilizando o inóculo de *A. marginale* em sangue bovino (item 3.1.2.4.1) (264 bactérias para cada célula). As células BME26 infectadas foram mantidas a $34 \text{ }^\circ\text{C}$ com uma troca semanal de meio. Transcorridos os tempos de infecção, o meio de cultivo foi descartado e a monocamada celular foi preparada de acordo com o protocolo descrito no item 3.3. e utilizada para: quantificar *A. marginale* por qPCR (item 3.1.2.1), determinar o percentual de infecção mediante contagem do número de células infectadas após coloração com o corante Panótico (Instant Prove., Paraná, PR., Brasil) e determinar a viabilidade celular (item 3.1.1). Foram realizadas duas réplicas biológicas.

3.5 Imunofluorescência

A análise das células BME26 após 1, 3, 7, 14 e 31 dias da infecção por *A. marginale* GFP foi realizada por imunofluorescência. Para isso, foi realizada uma infecção de 1×10^6 células BME26 em garrafas de 25 cm² utilizando um inóculo de 34 bactérias para cada célula. Aproximadamente, 1×10^5 células infectadas por *A. marginale* GFP foram aderidas na lâmina por centrifugação a 84 x g por 5 min em uma centrífuga Cytospin (Fanem., São Paulo, SP., Brasil). Após fixação com metanol 100% (Sigma-Aldrich) por 20 min, as lâminas secas foram lavadas duas vezes com PBS 1X durante 2 min. As células fixadas foram permeabilizadas usando 0,5% de Triton X-100 e 0,2% de gelatina em PBS 1X durante 10 min. Após a permeabilização, as lâminas foram incubadas duas vezes durante 2 min com uma solução de lavagem (0,1% Tween 20 em PBS 1X), seguida da incubação com a solução de bloqueio (0,1% de Tween 20, 5% de leite em pó desnatado em PBS 1X) durante 1 h. Transcorrida a etapa de bloqueio, as lâminas foram lavadas duas vezes com a solução de lavagem durante 2 min, seguido da incubação com o anticorpo monoclonal anti-GFP (*GFP Tag Monoclonal Antibody*, Life Technologies), diluído na solução de bloqueio (1:300) durante 1 h. Posteriormente, as lâminas foram tratadas uma vez com solução de lavagem durante 3 min e incubadas durante 30 min com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo *Alexa Fluor 488 (F(ab')₂-Goat anti-Rabbit IgG (H+L)*, Life Technologies) diluído em solução de bloqueio (1:1000). A seguir, as lâminas foram tratadas uma vez com a solução de lavagem e em seguida, incubadas com uma solução de contendo de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Life Technologies) e 0,003% de azul de Evans em PBS 1X (1:500) durante 10 min. Finalmente, foram feitas três lavagens com PBS 1X e as lâminas foram montadas adicionando uma gota de Prolong (Invitrogen) na preparação ainda úmida e colocando uma lamínula redonda por cima. As incubações com os diferentes marcadores foram feitas a temperatura ambiente em câmara úmida e na ausência de luz. As lâminas foram visualizadas usando uma Objetiva Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27, com zoom de 1.6x no tamanho de 1024x1024 pixels laser 405nm (DAPI) e 488nm (GFP) do Microscópio Confocal Multifotón – Zeiss LSM 780 NLO.

3.6 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise das células BME26 infectadas por *A. marginale* durante 1 e 6 h foi realizada por microscopia eletrônica. Para isso foi estabelecida uma infecção de 1×10^7 células BME26 em garrafas de 75 cm² utilizando o inóculo de *A. marginale* em células ISE6 (item 3.1.2.4.2) (50 bactérias para cada célula). Após a incubação, as células foram removidas usando Tripsina/EDTA (Vitrocell), transferidas para tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas a 3.000 x g por 10 min a 4 °C. Os sedimentos foram fixados com 2,5% de glutaraldeído (Sigma-Aldrich) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 48 h a 4 °C. Posteriormente, o sedimento foi lavado duas vezes por 15 min em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e incubado em 1% de tetróxido de ósmio em água destilada por 2 h, e então novamente lavado duas vezes por 15 min em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Por fim, o material foi lavado em 10% de álcool etílico (Sigma-Aldrich) por 15 min e contrastado em uma solução de 1% de acetato de uranila dissolvido em 10% de álcool etílico durante 2 h na ausência da luz. Transcorrido este período, o material foi desidratado em uma série gradativa de acetona (de 50 a 100% por 5 min para cada amostra). Posteriormente, o material foi embebido em resina Epon-Araldite e acetona (proporção 1:1, v/v) durante 24 h e incluído em resina Epon-Araldita. Para polimerização da resina, o material foi incubado a 60 °C por 72 h. Os blocos foram seccionados em ultramicrotomo Leica Reichert Supernova e os cortes foram depositados em grade de cobre. As preparações foram contrastadas em solução de 4% acetato de uranila durante 45 min, lavadas em água e contrastadas em citrato de chumbo por 10 min, sendo novamente lavadas em água e em solução de NaOH 0,02 M (Reynolds, 1963). As preparações foram visualizadas utilizando o Microscópio de Transmissão Jeol 1200 EXII.

3.7 Análise da expressão gênica das células BME26 expostas a diferentes desafios microbianos

3.7.1 Oligonucleotídeos

As sequências de nucleotídeos de sequências codificadoras de proteínas de *R. microplus* selecionadas para o presente estudo foram obtidas de um banco de dados de ESTs provenientes de ovos e das fases de ninfa e adulto desse carrapato (*Dana-Farber Cancer Institute (DCFI) Boophilus Gene Index* (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>; Guerrero et al., 2005). Somente a sequência *RmOXR1* foi obtida do banco de dados do transcriptoma de tecidos de *R. microplus* baseados na plataforma Illumina e depositado no NCBI (Amostra SAMN02463641). Para a análise das sequências, foram usados os programas *Softberry* (Mount Kisco., Nova Iorque., EUA), a base de dados de domínios conservados do NCBI e o programa *BioEdit Version 7.2.5* (Carlsbad., CA., EU). Os oligonucleotídeos foram desenhados manualmente e sintetizados pela *Life Technologies (Life Technologies., São Paulo, SP., Brasil)*. Os parâmetros para o desenho dos oligonucleotídeos foram: temperatura de anelamento entre 58 °C e 62 °C, tamanho de cada oligonucleotídeo de 20 pb a 21 pb, conteúdo em GC (glicina e cisteína) de aproximadamente 50% e tamanho do amplicon de 100 pb a 200 pb. A possível dimerização e auto-complementariedade de cada par de oligonucleotídeos, foi verificada usando o programa *FastPCR Professional* (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>) (Tabela 1).

3.7.2 Desafios microbianos

As células BME26 foram incubadas com *M. luteus* e *E. cloacae* (100 bactérias termo-inativadas para cada célula BME26) e *S. cerevisiae* (5 leveduras termo-inativadas para cada célula BME26). Para a infecção por *R. rickettsii*, foi usado um inóculo de $3,3 \times 10^{-2}$ de bactérias para cada célula BME26 e um lisado de células BME26 livre de patógenos como controle. Para a infecção por *A. marginale*, foi usado um inóculo de 941 bactérias para cada célula BME26 e eritrócitos bovinos livres de

infecção como controle. Transcorridas 6, 24, 48 e 72 h após os desafios, as células foram coletadas de acordo com o protocolo descrito no item 3.3 e utilizadas para determinar: a viabilidade das células BME26 (item 3.1.1), a modulação dos genes de interesse por RT-qPCR em larga escala (item 3.7.2.1) e a quantificação de *A. marginale* e *R. rickettsii* por qPCR (item 3.1.2.1).

Tabela 1 - Sequências de oligonucleotídeos usados para PCR, qPCR, RT-qPCR e síntese de dsRNA

(continua)

Sigla do gene	Nome do gene	Banco de dados [No. de acesso]	Oligonucleotídeo senso (S) e antisenso (AS)	Amplicon (pb)	Anotação funcional
<i>RmRIBS3A</i>	Proteína ribossomal S3A	GenBank [CV443892]	S 5' GGACGACCGATGGCTACCT 3' AS 5' TGAGTTGATTGGCGCACTTCT 3'	69	Gene de referência
<i>RmMALATE</i>	Malato desidrogenase	GenBank [CV455409]	S 5' AAAGTGTCCAGTACGAGTC 3' AS 5' TTCTTGACGAAGTCCTCTCC 3'	89	Gene de referência
<i>RmGLUDY</i>	Glutamato desidrogenase	GenBank [CK185727]	S 5' GCCAGACAAATCATGCGTAC 3' AS 5' AGCTAAGTGAAGGTGAGACC 3'	128	Gene de referência
<i>RmCYTORED</i>	Citocromo c oxidorreductase	GenBank [CK173844]	S 5' GGGAAGCTTCTGTTGACATG 3' AS 5' ATCAACCACTCTGGGTTCTG 3'	79	Gene de referência
<i>RmNOS</i>	Óxido nítrico sintase	GenBank [CV438673]	S 5' CCAATGACAAAGAAGTGC GG 3' AS 5' ACTAATCCGCATACGACAGC 3'	119	Gene pró-oxidante
<i>RmERO1</i>	Oxidase do retículo endoplasmático	GenBank [CV453012.1]	S 5' ATGGCCCATACACGACATCC 3' AS 5' ACGTTGATACTGGCGTGTAG 3'	97	Gene pró-oxidante
<i>RmDUOX1</i>	Dual oxidase 1	GenBank [CV442800.1]	S 5' CGTTACTCAGTGTCTCACTC 3' AS 5' ATGACTGCGCAACACATGTG 3'	141	Gene pró-oxidante
<i>RmDUOX2</i>	Dual oxidase 2	GenBank [CV449552]	S 5' CAGAATGTTGCCTTAGTTCG 3' AS 5' CGATGTCGTACATGTCTGAAC 3'	134	Gene pró-oxidante
<i>RmMnSOD</i>	Superóxido dismutase dependente de manganês	GenBank [CV442321]	S 5' AGACGCAGAGGCTACAAGTG 3' AS 5' AGTTGGCAATGTCCCAGATG 3'	165	Gene antioxidante
<i>RmCu/ZnSOD</i>	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco	GenBank [CK178001]	S 5' AAGGTGGGACAAACGATAGC 3' AS 5' CGCAAGTAGCTTCAAACACC 3'	175	Gene antioxidante
<i>RmCAT</i>	Catalase	GenBank [CK175079]	S 5' TTCATGGAGATGTTGACCGC 3' AS 5' TGAAGTCCTGAGCATCCTTC 3'	144	Gene antioxidante
	Oligonucleotídeos para síntese de <i>RmdsCAT</i>		S 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCCTTACCTC</u> TAACATCGCC 3' AS 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGTCTAGTAGC</u> GTGATGCAGC 3'	275	
<i>RmGPX</i>	Glutaciona peroxidase	GenBank [CV440147]	S 5' TCTCTGTTGGTGACTGAGAC 3' AS 5' TGAGTGTTTCAGTCCATGGTG 3'	184	Gene antioxidante

(continuação)

			S 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGCAAGGACAT</u> TGAGGCCTATG 3'		
	Oligonucleotídeos para síntese de <i>RmdsGPX</i>		AS 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGTTCCAGAA</u> GGCACATCGTAC 3'	392	
<i>RmPHGPX</i>	Glutaciona peroxidase de hidroperóxidos de lipídeos	GenBank [CK174162]	S 5' AAGTATGCAGAGTCCAAGGG 3' AS 5' CCTTGCTGAACATGTCGAAC 3'	136	Gene antioxidante
<i>RmGST1</i>	Glutaciona-S-transferase	GenBank [CK180220]	S 5' AGCAGCCAATGGCAACATTA 3' AS 5' TTCGCACTCCTTCACCTCAT 3'	100	Gene antioxidante
<i>RmGST2</i>	Glutaciona-S-transferase	GenBank [CK191620]	S 5' ACACTTGTCTTCGAGGTTCC 3' AS 5' TAAGCGTACTCAAGCCGGTG 3'	136	Gene antioxidante
<i>RmGST3</i>	Glutaciona-S-transferase	GenBank [CK191255]	S 5' TTACGAAGGGTTCGACACTC 3' AS 5' ATACTTGTGGTACTTGTCCGAC 3'	139	Gene antioxidante
<i>RmGST4</i>	Glutaciona-S-transferase	GenBank [CK178638]	S 5' TGAAGGGTGACTACCTCAAG 3' AS 5' TGAGGTTGGCGAAGTCCTTC 3'	177	Gene antioxidante
<i>RmTRX</i>	Tiorredoxina	GenBank [CK190673]	S 5' TGGTACGCCCTCAAGTATGG 3' AS 5' GTCCATTGGCAGTGATCACG 3'	121	Gene antioxidante
<i>RmTRXR</i>	Tiorredoxina redutase	GenBank [CV451339]	S 5' CAGACTTGGATGCCACCATC 3' AS 5' ACACGGAGGGTGTTACTATG 3'	185	Gene antioxidante
	Oligonucleotídeos para síntese de <i>RmdsTRX</i>		S 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGATGTCC</u> AGTGTGACTAC 3'		
			AS 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGTCACAGTC</u> AGGGTCGTGAAG 3'	372	
<i>RmPRX</i>	Peroxirredoxina	GenBank [CK179571]	S 5' TGATGACAAGGGCAACCTTC 3' AS 5' GTAGGGATGATCGTATCTCC 3'	162	Gene antioxidante
<i>RmOXR1</i>	Gene de resistência à oxidação	Rm-177604	S 5' TCCAATAGACCTGACTGACC 3' AS 5' TGAAACATGGCTTCAGCCTC 3'	160	Proteção contra o estresse oxidativo
	Oligonucleotídeos para síntese de <i>RmdsOXR1</i>		S 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGAGCTGTGCA</u> AGCACCTTCCA 3'		
			AS 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGCGATAACG</u> ACGTGCTCTCTA 3'	411	

						(conclusão)
<i>PfMSP1</i>	Proteína de superfície	GenBank [AF061132.1]	S 5' TGTTGGTTGTCCTCTTTCCCGATGT 3' AS 5' TTGTCGACTTCATGTTTGGCGGTG 3'			Proteína de superfície
	Oligonucleotídeos para síntese de <i>PfdsMSP1</i>		S 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGCTGATGCAA</u> GCGATTCAGAT 3' AS 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGTGTATTTCC</u> CAGAATTGGCC 3'	666		
<i>AmMSP5</i>	Proteína 5 de superfície	GenBank [M93392.1]	S 5' CTTCCGAAGTTGTAAGTGAGGGCA 3' AS 5' CTTATCGGCATGGTCGCCTAGTTT 3' Sonda <i>TaqMan</i> : 5'-56 FAM/GCCTCCGCGTCT TTCAACAATTTGGT/BHQ1 3'	203		Proteína de superfície
<i>RrGLTA</i>	Citrato sintase	GenBank [CP000848.1]	S 5' AGCAGCCAATGGCAACATTA 3' S 5' GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT 3' AS 5' AGGGTCTTCGTGCATTTCTT 3' Sonda <i>TaqMan</i> : 5'-56 FAM/CATTGTGCCATCC AGCCTACGGT/BHQ1 3'	147		Ciclo de Krebs

A sequência promotora T7 está sublinhada nos oligonucleotídeos usados para síntese de *dsRNA*. *Rm*: *Rhipicephalus microplus*, *Pf*: *Plasmodium falciparum*, *Am*: *Anaplasma marginale*, *Rr*: *Rickettsia rickettsii*.

3.7.2.1 RT-qPCR em larga escala

O perfil de modulação dos genes que codificam enzimas pró-oxidantes e antioxidantes de *R. microplus* nas células BME26 foi determinado usando a plataforma microfluídica de alto rendimento (*Fluidigm 96, 96*) (Spurgeon et al., 2008).

O RNA total (230 ng) obtido das células BME26 desafiadas com diferentes microrganismos (item 3.7.2) foi usado para a síntese de cDNA (item 3.2). Adicionalmente, foi sintetizado cDNA a partir do RNA extraído de um conjunto de diferentes tecidos de *R. microplus* como controle positivo das reações. O cDNA molde foi amplificado em placa de 96 poços, acrescentando 2,5 µL de uma mistura dos oligonucleotídeos senso e antisenso (200 nM cada um) específicos para cada gene (Tabela 1) e 5 µL do *mix* de pré-amplificação (*TaqMan PreAmp Master Mix 2X, Applied Biosystems*) a 2,5 µL do cDNA. A placa foi vedada, centrifugada a 1.000 x g por 2 min a 4 °C e transferida para um termociclador StepOnePlus (*Applied Biosystems*). O programa térmico usado na qPCR foi: 95 °C por 10 min seguido de 14 ciclos a 60 °C por 15 s e 60 °C por 4 min. O programa térmico para a PCR convencional e a síntese das duplas fitas de RNA foi: 95 °C por 30 s seguido de 30 ciclos a 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min.

Uma solução de cada par de oligonucleotídeos foi preparada em um volume final de 5 µL, contendo 2,5 µL do *Assay Loading Reagent 2X (Fluidigm Corporation, São Francisco, CA., EUA)*, 1,25 µL da mistura de cada par de oligonucleotídeos (20 µM) e 1,25 µL de tampão TE (Tris base 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5). Separadamente, uma mistura de reação em 5 µL contendo 1,25 µL de cada cDNA pré-amplificado (diluído 1:5 em tampão TE), 2,5 µL de *TaqMan Gene Expression Master Mix 2X (Applied Biosystems)*, 0,25 µL de *DNA Binding Dye Sample Loading Reagent 20X (Fluidigm Corporation)*, 0,25 µL de *Eva Green 20X (Biotium., Hayward, CA., EUA)* e 0,75 µL de tampão TE. A solução dos oligonucleotídeos e a mistura de reação foram distribuídas na placa microfluídica e em seguida, a placa foi mantida no equipamento *IFC Controller HX (Fluidigm Corporation)* durante 1 h com a finalidade de distribuir as duas preparações mediante aplicação de pressão. A placa foi transferida para o qPCR multiplex (BioMark, Fluidigm) seguindo o programa térmico de 95 °C por 10 min seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

A especificidade do produto amplificado de RT-qPCR foi determinada analisando a curva de dissociação mediante o incremento da fluorescência em 0,5 °C de 60 °C a 95 °C. A eficiência dos oligonucleotídeos foi verificada usando diferentes concentrações de cDNA e monitoramento da amplificação por RT-qPCR.

Os valores de Cq (do inglês, *Cycle quantification*) foram obtidos usando o programa *BioMark™ Real Time PCR Analysis (Fluidigm Corporation)*. Os genes da proteína ribossomal S3A, malato desidrogenase, glutamato desidrogenase e citocromo c oxidorreductase, foram usados como genes de referência (Tabela 1). Os resultados de expressão gênica foram calculados como a variação na expressão de cada um dos genes em comparação com as células controle calibradas para a média geométrica dos valores de Cq dos quatro genes de referência. A expressão dos genes das células BME26 submetidas a diferentes desafios foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001). As células BME26 livres no tempo zero, foram usadas como condição calibradora para os desafios com os microrganismos termo-inativados *M. luteus*, *E. cloacae* e *S. cerevisiae*. As células BME26 incubadas com eritrócitos bovinos durante 6, 24 e 72 h, foram usadas como condição calibradora para a infecção por *A. marginale* durante 6, 24 e 72 h, respectivamente. As células BME26 tratadas com lisado de células BME26 durante 6, 24 e 72 h, foram usadas como condição calibradora para a infecção por *R. rickettsi* durante 6, 24 e 72 h, respectivamente. Foram realizadas três réplicas biológicas e a análise global da expressão genica foi realizada usando o programa *Multiexperiment Viewer (MeV)* (<http://www.tm4.org/mev.html>).

3.7.2.2 RT-qPCR em pequena escala

As células BME26 foram incubadas com *A. marginale* (10 bactérias para cada célula) ou lisado de células ISE6 como controle. Transcorridas 1 ou 6 h de incubação, as células foram coletadas (item 3.3) e utilizadas para determinar a modulação dos genes de interesse (item 3.2) e a quantificação de *A. marginale* (item 3.1.2.1).

A expressão dos genes *RmDUOX2*, *RmMnSOD*, *RmCAT*, *RmGPX*, *RmTRXR*, *RmOXR1*, *RmRIBS3A* das células BME26 desafiadas com *A. marginale* foi determinada por RT-qPCR. Os cDNAs das células foram sintetizados como descrito no item 3.2. Em uma placa de 96 poços, foi feita a mistura de reação em um volume final de 15 µL, contendo 7,5 µL do *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X* (*Thermo Scientific*), 1,2 µL da mistura de cada par de oligonucleotídeos (0,4 µM), 5,3 µL de H₂O tratada com DEPC e 2 µL de cDNA. A placa foi vedada, centrifugada a 1.000 x g por 2 min a 4 °C e transferida para um termociclador StepOnePlus (*Applied Biosystems*) usando o programa térmico descrito no item 3.7.2.1.

Os valores de Cq foram obtidos usando o programa *StepOne Software Version 2.3*. Os resultados apresentados foram calculados como a variação da expressão dos genes *RmDUOX2*, *RmMnSOD*, *RmCAT*, *RmGPX*, *RmTRXR* e *RmOXR1* em comparação com as células controle calibradas para a média geométrica dos valores de Cq do gene *RmRIBS3A* (Tabela 1). A expressão dos genes das células BME26 incubadas com *A. marginale* ou com lisado de células ISE6 (condição calibradora), foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ descrita por Livak e Schmittgen (2001). Foram feitas de sete a dez réplicas biológicas e análise estatística foi feita pelo programa *GraphPad Prism Version 6.0* usando o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Este teste foi usado para comparar valores entre as células incubadas com *A. marginale* e lisado de células ISE6. A maior separação dos dados em conjunto, indica que as amostras dos grupos são distintas, consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$, rejeitando a hipótese de igualdade de medianas.

3.7.3 Silenciamento de genes antioxidantes por RNAi

3.7.3.1 Produção de dsRNA

Primeiramente, cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total obtido de células BME26 e a enzima *SuperScriptIII™* (*Life Technologies*) (item 3.2). Para amplificar o cDNA dos genes *RmCAT*, *RmGPX*, *RmTRXR* e *RmOXR1*, foram utilizados os oligonucleotídeos descritos na tabela 1 contendo a sequência

promotora T7. Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose e purificados usando o *kit GeneJet Purification* (Fermentas., São Paulo, SP., Brasil) seguindo as orientações do fabricante. A síntese das *dsRNAs* foi realizada utilizando o *kit T7 Ribomax™ Express RNAi System* (Promega., Madison, WI., EUA), a partir de 950 ng de cada um dos produtos anteriormente obtidos do gel de agarose.

3.7.3.2 Tratamento das células BME26 com *dsRNAs* e infecção com *A. marginale*

As células BME26 obtidas como descrito no item 3.3 foram incubadas com 1 mL de meio de cultivo contendo o equivalente a 10^{13} moléculas de cada *dsRNA*. As células foram tratadas simultaneamente com *RmdsCAT*, *RmdsGPX* e *RmdsTRXR* ou individualmente com *RmdsOXR1*. Como controle, foi usado o gene não relacionado *PfMSP1* (*dsPfMSP1*) que codifica a proteína de superfície MSP1 em *P. falciparum* (Tabela 1; gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gerhard Wunderlich do Depto. de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo). Após 24 h de incubação com as *dsRNAs*, as células foram infectadas com um inóculo de 9 bactérias (para o triplo silenciamento) e 64 bactérias (para o silenciamento da *RmOXR1*) para cada célula, como descrito no item 3.1.2.4.2.

3.7.3.3 Avaliação do silenciamento gênico e quantificação de *A. marginale* nas células BME26 tratadas com as *dsRNAs*

Transcorridos três dias, foi realizado isolamento de DNAg utilizado para a quantificação de *A. marginale* (item 3.1.2.1) e foi realizada a extração de RNA seguida da síntese de cDNA (item 3.2). O cDNA foi utilizado para avaliar o silenciamento gênico pelo tratamento com as *dsRNAs* (item 3.7.3.2). A expressão gênica das células incubadas com *RmdsCAT*, *RmdsGPX*, *RmdsTRXR*, *RmdsORX1* e *RmdsPfMSP1* (controle) foi calculada como a variação na expressão de cada um dos genes em comparação com as células controle calibradas para a média geométrica dos valores de Cq do gene *RmRIBS3A* (Tabela 1). A expressão dos

genes das células BME26 incubadas com as diferentes dsRNAs e com *A. marginale* foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Foram feitas de cinco a dez réplicas biológicas e análise estatística for feita pelo programa *GraphPad Prism Version 6.0* usando o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Este test foi usado para comparar valores entre as células incubadas com as *RmdsCAT*, *RmdsGPX*, *RmdsTRXR*, *RmdsORX1* e *RmdsPfMSP1* (controle) infectadas por *A. marginale*. A maior separação dos dados em conjunto, indica que as amostras dos grupos são distintas, consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$, rejeitando a hipótese de igualdade de medianas.

3.8 Dosagem de H₂O₂ e da atividade da CAT e GPX

Foram semeadas aproximadamente 5×10^4 células BME26 por poço de placas de 24 poços (Nunc, *Thermo Scientific*, Pittsburg, PE., EUA), as quais foram mantidas sob as mesmas condições descritas no item 3.3. Para a infecção, foi utilizado o inóculo de *A. marginale* em células ISE6 (item 3.1.2.4.2) usando 34 bactérias para cada célula BME26. Como controle, as células foram expostas ao lisado de células ISE6. Transcorridas 1, 6, 24 e 72 h após a infecção, os sobrenadantes ou as células foram coletados para as análises descritas nos itens 3.8.1, 3.8.2 e 3.8.3.

3.8.1 Dosagem de H₂O₂ em células BME26 incubadas com *A. marginale*

A dosagem do H₂O₂ foi realizada a partir do protocolo modificado do fabricante do kit *Amplex Red Hydrogen Peroxide* (*Life Technologies.*, São Paulo, SP., Brasil). O meio de cultivo presente em cada poço foi descartado e a monocamada celular foi lavada duas vezes com tampão Krebs (NaCl 145 mM, fosfato de sódio 5,7 mM, KCl 4,86 mM, CaCl₂ 0,54 mM, MgSO₄ 1,22 mM e glicose 5,5 mM, pH 7,35). Após as lavagens, as células foram incubadas em 100 µL de tampão Krebs contendo *Amplex* e peroxidase de rábano (HRP, do inglês *Horseradish peroxidase*) (*Life Technologies*) a uma concentração final de 100 µM e 0,2 U/mL, respectivamente, e o inóculo de *A.*

marginale. As células foram submetidas a incubação por 1, 6, 24 e 72 h a 34 °C protegidas da luz. Paralelamente, as células BME26 foram incubadas com o lisado de células ISE6 (controle) ou com o composto pró-oxidante Menadiona (Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 125 µM (controle positivo). Transcorridos os tempos de incubação, o meio de infecção dos poços contendo a sonda foi centrifugado a 10.000 x g por 2 min e o sobrenadante obtido foi transferido para placas de fluorimetria Costar (Corning., Nova Iorque., EUA). Os valores de H₂O₂ obtidos para cada amostra foram calculados a partir de uma curva padrão previamente estabelecida (0,048 - 500 pmol) de H₂O₂. A fluorescência foi determinada em fluorímetro Spectramax 190 (*Molecular Devices.*, Toronto, Canadá) a uma excitação e emissão de 560 e 590 nm, respectivamente. O experimento de 1 e 6 h foi feito separadamente do experimento de 24 e 72 h. Foram feitas de três a seis réplicas biológicas e análise estatística foi feita pelo programa *GraphPad Prism Version 6.0* usando o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Este teste foi usado para comparar valores entre as células incubadas com *A. marginale*, menadiona e lisado de células ISE6 (usados como controle). A maior separação dos dados em conjunto, indica que as amostras dos grupos são distintas, consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$, rejeitando a hipótese de igualdade de medianas.

3.8.2 Dosagem da atividade CAT intracelular em células infectadas com *A. marginale*

A dosagem da atividade catalase em células BME26 infectadas com *A. marginale* foi realizada a partir do protocolo modificado do fabricante do kit *Amplex Red Hydrogen Peroxide* (*Life Technologies*). Para determinar a atividade intracelular da catalase, foram coletadas as células infectadas ou não (controle) usando Tripsina/EDTA (Vitrocell). Após o descolamento, as células foram centrifugadas a 16.000 x g por 2 min e os sedimentos foram ressuspensos em 100 µL de tampão de lise (saponina 0,1%, aprotinina 80 µM, bestatina 4 mM, E-64 1,4 mM, leupeptina 2 mM e pepstatina 1,5 mM diluído em tampão Krebs). Do lisado, foram transferidos 25 µL para placas de fluorimetria Costar (Corning) e incubados na presença de 40 µM de H₂O₂ durante 30 min. Adicionalmente, 25 µL de cada amostra foram

incubadas com 60 mM de aminotriazol (AT) (Sigma-Aldrich) (inibidor específico da catalase) durante 5 min para verificar a especificidade da reação. Após a incubação, foram adicionados *Amplex* e HRP a uma concentração final de 100 μ M e 0,4 U/mL, respectivamente, durante 30 min e protegido da luz. Os valores da atividade da catalase foram calculados a partir de uma curva padrão previamente estabelecida (0 - 0,5 mU/mL de catalase). O resultado é obtido a partir da subtração de cada valor da fluorescência proveniente dos tratamentos do valor da amostra sem catalase. A fluorescência foi quantificada como descrito no item 3.8.1. Foram feitas seis réplicas biológicas e análise estatística for feita pelo programa *GraphPad Prism Version 6.0* usando o teste não paramétrico *Mann-Whitney* como descrito no item 3.8.1. Este test foi usado para comparar valores entre as células incubadas com *A. marginale*, lisado de células ISE6 e a combinação com AT como inibidor enzimático (controle). Os dados foram significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

3.8.3 Dosagem da atividade GPX intracelular em células infectadas com *A. marginale*

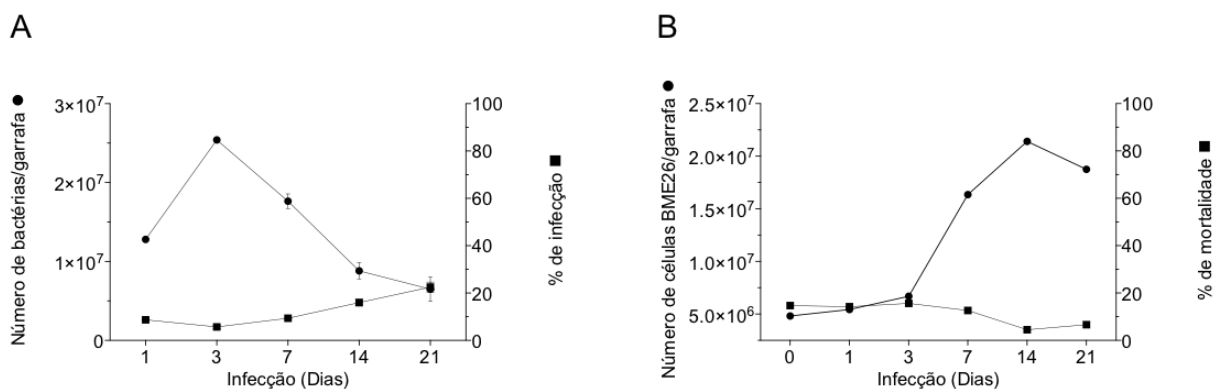
A dosagem da atividade peroxidase em células BME26 infectadas com *A. marginale* foi realizada usando o mesmo protocolo para a dosagem de atividade catalase intracelular. Os sedimentos obtidos das células infectadas ou não (controle) foram ressuspensos em 50 μ L de tampão de lise e incubado com 50 μ L da sonda *Amplex* e H_2O_2 a uma concentração final de 100 μ M e 2 mM, respectivamente durante 30 min e protegido da luz. Transcorrido o tempo de incubação, o material contendo a sonda *Amplex* foi transferido para placas de fluorimetria Costar (Corning). Os valores de atividade de peroxidase de cada amostra foram calculados a partir de uma curva padrão previamente estabelecida (0 - 2 mU/mL de peroxidase). A fluorescência foi quantificada como descrito no item 3.8.1 Foram feitas seis réplicas biológicas e análise estatística for feita pelo programa *GraphPad Prism Version 6.0* usando o teste não paramétrico *Mann-Whitney* como descrito no item 3.8.1. Este test foi usado para comparar valores entre as células incubadas com *A. marginale* e lisado de células ISE6 (controle). Os dados foram significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento da infecção de *A. marginale* nas células BME26

O crescimento da *A. marginale* nas células BME26 foi determinado ao longo de 21 dias de infecção. Em determinados tempos após a infecção (0, 1, 3, 7, 14 e 21 dias) foram retiradas alíquotas da cultura celular para a quantificação das bactérias e das células BME26. Observou-se que o número de bactérias por garrafa atingiu um valor máximo no dia 3, decaindo cerca de 4 vezes no dia 21 (Figura 4A). No entanto, verificou-se um aumento de células infectadas ao longo dos 21 dias, atingindo 23% de infecção no final do experimento (Figura 4A). Na figura 4B estão mostrados os resultados do crescimento e o percentual da mortalidade das células BME26. Nota-se um crescimento exponencial até aproximadamente 14 dias, quando então atinge uma fase estacionária. O crescimento das BME26 é lento com uma taxa de duplicação de 6 - 7 dias. Além disso, a quantidade de células mortas é relativamente constante ao longo do experimento, com uma taxa de mortalidade celular inferior a 20%. Os resultados apresentados na figura 4 sugerem que as células BME26 controlam a proliferação de *A. marginale*, o que reflete na baixa taxa de mortalidade da célula hospedeira.

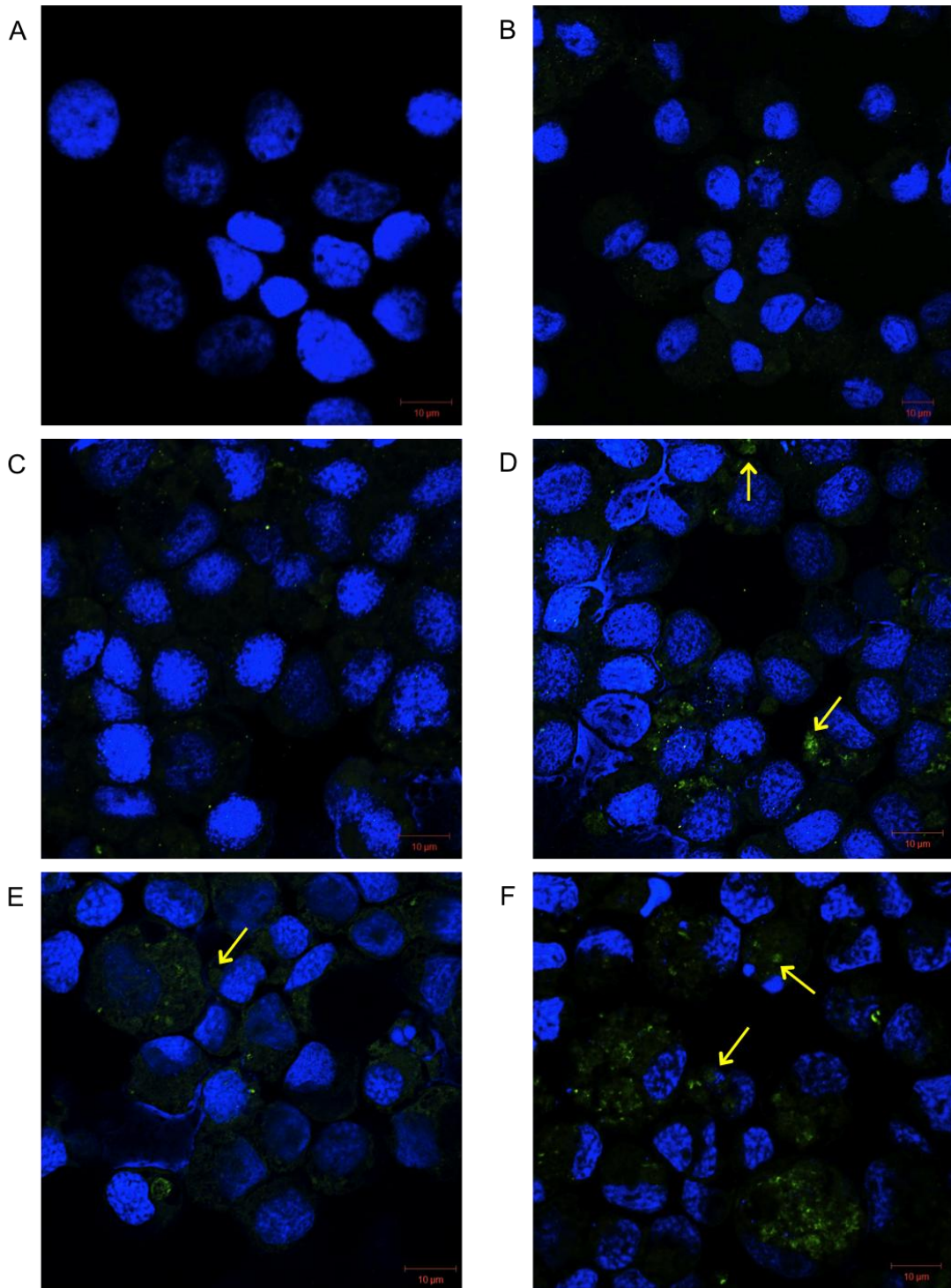
Figura 4 - Cinética da infecção de *A. marginale* nas células BME26



Para a determinação da cinética de crescimento, foi usado um inóculo de $1,27 \times 10^9$ bactérias/garrafa proveniente de sangue de bovino infectado. (A) O crescimento da *A. marginale* foi avaliado por qPCR usando a sonda *TaqMan* para o gene específico de cópia única *AmMSP5* (●) e a porcentagem de infecção foi determinada através da coloração por panótico e microscopia de luz (■). (B) O número das células BME26 (●) e a porcentagem de mortalidade (■) foram avaliadas por microscopia de luz através da coloração por azul de tripano. Os valores representam a média de duas réplicas biológicas.

Após a determinação da cinética da infecção de *A. marginale* foram realizadas análises das células BME26 infectadas por microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão. O conhecimento dos processos iniciais da infecção foi importante para definir os parâmetros a serem utilizados nos experimentos de caracterização do estresse oxidativo frente à infecção. As imagens obtidas pela microscopia confocal das células BME26 com 1, 3, 7, 14 e 31 dias após a infecção por *A. marginale* GFP estão mostradas na figura 5. Durante os primeiros três dias de infecção (Figuras 5B e 5C) não foi detectada *A. marginale* GFP, somente a partir do sétimo dia de infecção é que foram evidenciadas células infectadas contendo colônias de bactérias (Figura 5D, setas amarelas). A partir do décimo-quarto dia de infecção observou-se uma maior quantidade de células infectadas, assim como colônias maiores no interior das células BME26 (Figura 5E, seta amarela). A maior taxa de infecção foi detectada após 31 dias de infecção (Figura 5F, setas amarelas). Concluindo, observou-se um aumento no número de células infectadas ao longo do experimento, de forma semelhante ao observado através da coloração por Panótico (Figura 4A). No entanto, como por microscopia confocal não foi possível visualizar a etapa inicial da infecção, ou seja, a internalização das bactérias, analisou-se as células BME26 por microscopia eletrônica de transmissão.

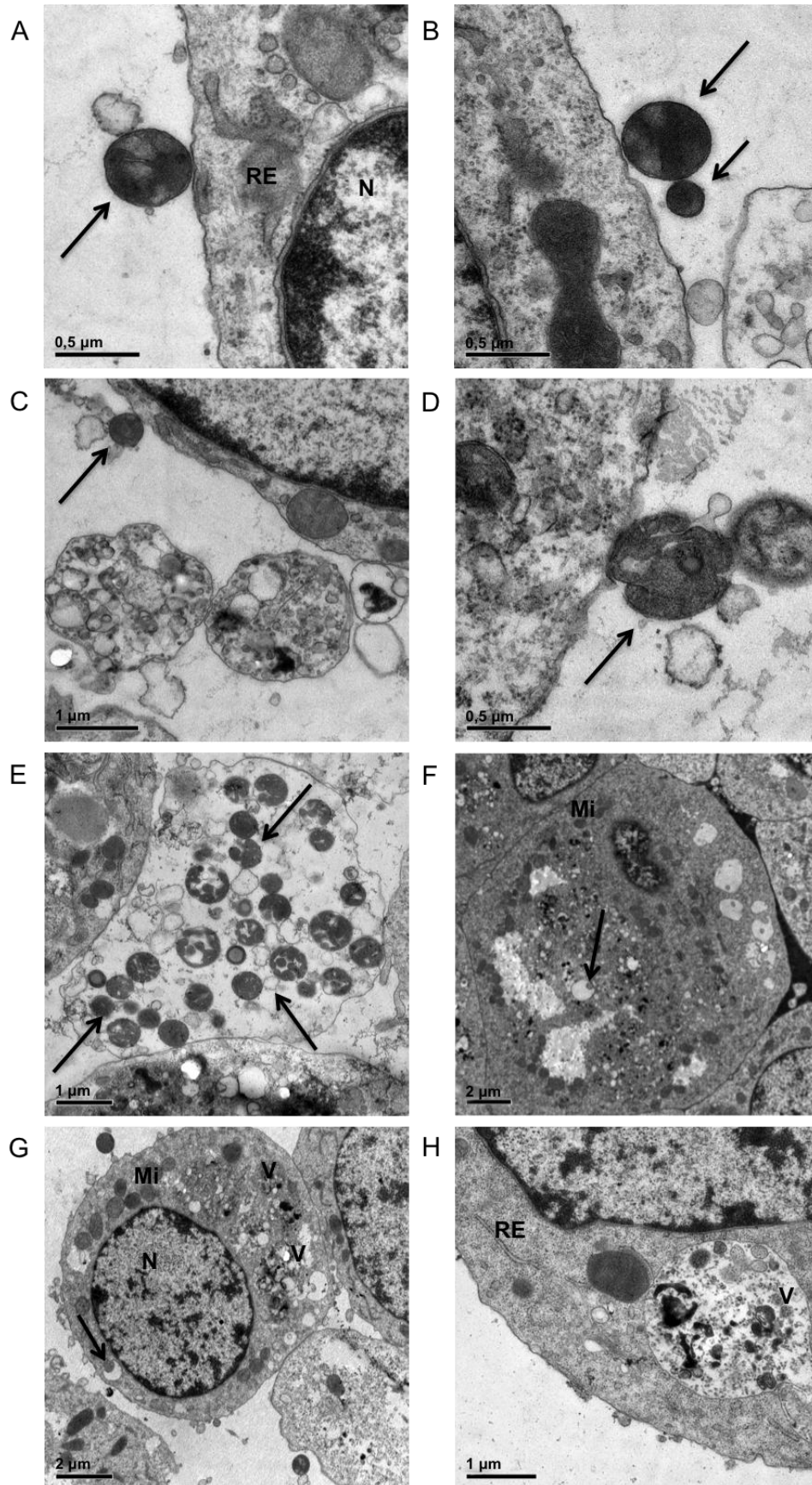
Figura 5 - Células BME26 infectadas por *A. marginale* GFP analisadas por microscopia confocal



(A) Células BME26 não infectadas. Células BME26 infectadas por *A. marginale* GFP (setas amarelas) após (B) 1 dia, (C) 3 dias, (D) 7 dias, (E) 14 dias e (F) 31 dias. As células removidas das garrafas de cultura foram aderidas em lâminas de vidro através de uma centrifugação a $84 \times g$ por 50 s em uma centrífuga Cytospin®. As bactérias foram identificadas por imunomarcação utilizando o anticorpo monoclonal anti-GFP como anticorpo primário e anti-IgG de coelho, acoplado ao conjugado *Alexa Fluor 488* como anticorpo secundário. Os núcleos foram marcados em azul por DAPI. Barra de escala: 10 μm .

As imagens das células BME26 após 1 h de infecção estão mostradas na figura 6. Foram observadas bactérias eletrodensas com aproximadamente 500 nm na superfície das células BME26 (Figuras 6A-D, setas pretas). É possível visualizar a dupla membrana plasmática das bactérias (Figuras 6A e 6B). Observou-se também a formação de um pedestal na membrana celular que antecede a internalização das bactérias (Figura 6D). Na figura 6E está indicado um vacúolo contendo bactérias, provavelmente proveniente do inóculo, enquanto que nas figuras 6F e 6G observa-se bactérias dentro dos vacúolos parasitóforos próximos à membrana das células. Na figura 6H evidencia-se uma vesícula grande contendo material heterogêneo, provavelmente de natureza lipídica como descrito por Esteves et al. (2008). Portanto, pelos resultados apresentados conclui-se que a internalização de *A. marginale* nas células BME26 ocorre na primeira hora de infecção.

Figura 6 - Células BME26 infectadas por *A. marginale* analisadas por microscopia eletrônica de transmissão



Células BME26 infectadas por *A. marginale* (setas) após 1h. (A), (B), (C) e (D) Bactérias eletrodensas na superfície da célula BME26. (E) Vacúolo repleto de bactérias. (F) e (G) Bactérias internalizadas no vacúolo. (H) Vesícula apresentando conteúdo heterogêneo. As células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, tratadas com tetróxido de ósmio 1% e embebidas em resina Epon-Araldita pura. Os blocos foram seccionados em ultra-micrótomo e contrastados em solução de acetato de uranila 2%. N: núcleo. RE: retículo endoplasmático. MI: mitocôndria. V: vesícula com conteúdo lipídico. Barra de escala: 0,5 µm (A, B e D), 1 µm (C, E e H) e 2 µm (F e G).

4.2 Perfil da expressão de genes envolvidos na produção e destoxificação de ERO e ERN nas células BME26 desafiadas por diferentes microrganismos

Inicialmente apresentamos uma comparação da infecção das células BME26 incubadas com *A. marginale* e *R. rickettsii* ao longo de 3 dias (Figura 7A). No experimento com *A. marginale*, o número de bactérias se manteve constante ao longo da infecção (aproximadamente de 5×10^7 bactérias/garrafa). Por outro lado no experimento com *R. rickettsii*, não foi possível quantificar as bactérias das amostras de 6 e 24 h, por estar abaixo do limite de detecção do método utilizado e após 48 h de infecção, detectou-se 2×10^6 bactérias/garrafa. Durante a infecção por *A. marginale* foi verificada uma baixa taxa de mortalidade das células BME26 (menor que 20%), enquanto que na infecção por *R. rickettsii* atingiu cerca de 45% após 72 h (Figura 7B). Portanto, observa-se uma taxa de crescimento bacteriano e viabilidade das células BME26 diferencial durante a infecção pelas duas riquetsias.

A modulação dos genes envolvidos nas diferentes vias de produção e destoxificação das ERO e ERN foi avaliada nas células BME26 desafiadas por *A. marginale*, *R. rickettsii* e microrganismos termo-inativados (*M. luteus*, *E. cloacae* e *S. cerevisiae*) por RT- qPCR (Figura 7C). Selecionou-se para esta análise 4 genes pró-oxidantes (Figura 7C [i]) e 12 genes antioxidantes (Figura 7C [ii]). O grupo dos genes pro-oxidantes é composto por *RmNOS* (óxido nítrico sintase, catalisa a produção de NO^*); *RmERO1* (oxidase do retículo endoplasmático, catalisa a formação de pontes de dissulfeto com a produção de H_2O_2); *RmDUOX* (*dual oxidase*, catalisa a produção de H_2O_2). O grupo dos genes antioxidantes é composto por *RmMnSOD* - *RmCu/ZnSOD* (*superóxido dismutase*, dismuta o ânion O_2^- a H_2O_2); *RmCAT* (*catalase*, reduz H_2O_2); *RmGPX* (*glutathione peroxidase*, reduz H_2O_2 na presença de GSH); *RmPHGPX* (*glutathione peroxidase de hidroperóxidos de lipídeos*, reduz LOOH

na presença de GSH); *RmGST* (*glutathione S-transferase*, conjuga GSH a substratos xenobióticos, *RmTRX* (tioredoxina, catalisa a redução de pontes de dissulfeto de proteínas alvo); *RmTRXR* (*tioredoxina redutase*, catalisa a redução de pontes de dissulfeto das tioredoxinas); *RmPRX* (*peroxirredoxina*, reduz H_2O_2 , ROOH e $ONOO^-$).

A maioria dos genes pró-oxidantes tiveram uma redução nos transcritos em resposta à infecção por *A. marginale*, com exceção dos transcritos de *RmNOS* que foram induzidos em 6 e 72 h após a infecção (Figura 7C). No entanto, os genes que codificam enzimas antioxidantes clássicas como a *RmMnSOD*, *RmCu/ZnSOD*, *RmCAT* e as enzimas tiol-dependentes como a *RmGPX*, *RmTRXR* e *RmPRX* foram induzidos. Um perfil similar foi encontrado para os genes que codificam as diferentes GSTs, com exceção da *RmGST2* que foi reprimida 6 h após a infecção (Figura 7C).

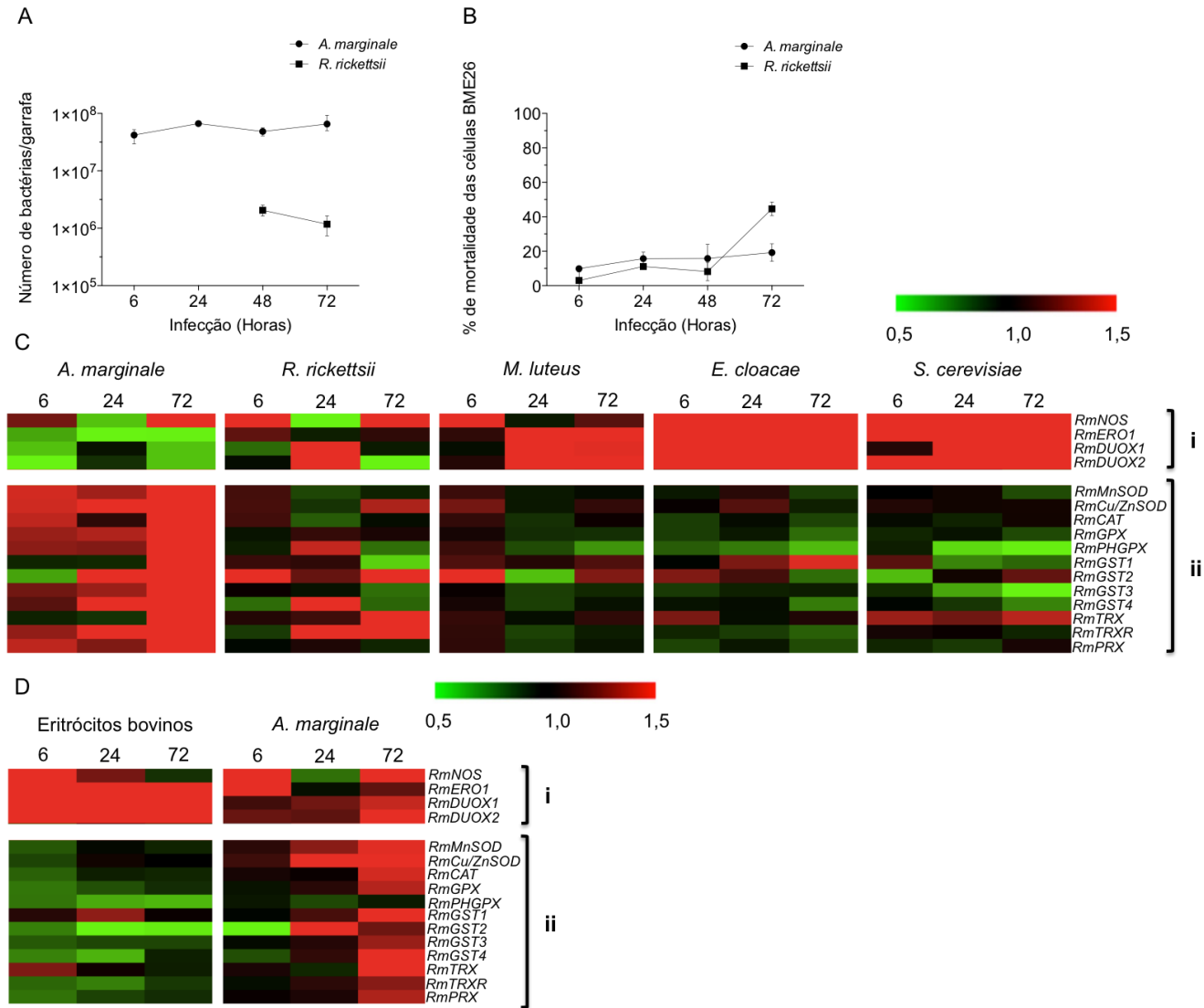
Por outro lado, o perfil da modulação dos genes pró-oxidantes e antioxidantes durante a infecção por *R. rickettsii* é relativamente diferente do obtido com *A. marginale*, uma vez que detectou-se uma proporção maior de genes pró-oxidantes induzidos e genes antioxidantes reprimidos. Para exemplificar, temos que em 24 h de infecção, a transcrição dos genes pró-oxidantes *RmDUOX1* e *RmDUOX2* é maior na presença de *R. rickettsii* do que com *A. marginale*, enquanto que os genes antioxidantes *RmMnSOD*, *RmCu/ZnSOD*, *RmCAT* estão reprimidos com *R. rickettsii* e induzidos com *A. marginale*. Após 72 h, a grande maioria dos genes antioxidantes analisados no experimento com *R. rickettsii* foi inibida provavelmente em decorrência em parte pela morte das células BME26 (45%) (Figuras 7B e 7C).

Nos estímulos com microrganismos termo-inativados (*M. luteus*, *E. cloacae* e *S. cerevisiae*), nota-se um aumento na expressão de todos os genes pró-oxidantes e uma redução na expressão da maioria dos genes antioxidantes, uma resposta diferente da obtida com o desafio das riquetsias (Figura 7C).

Com o intuito de comparar a modulação gênica ocasionada pelos eritrócitos bovinos com a da infecção por *A. marginale*, utilizamos as células BME26 livres como condição calibradora para construir o gráfico mostrado na figura 7D. Como resultado observou-se uma indução dos genes pró-oxidantes pelos eritrócitos bovinos assim como pela infecção por *A. marginale* (Figura 7D [i]). Por outro lado, os genes que codificam enzimas antioxidantes foram inibidos pelos eritrócitos bovinos em todos

tempos analisados (6, 24 e 72 h) e pela infecção por *A. marginale* apenas em 6 h. A partir de 24 h, a maioria dos genes antioxidantes foi induzida por *A. marginale* (Figura 7D [ii]). Portanto, nossos resultados sugerem que os eritrócitos bovinos levam a um estado mais pró-oxidante e que *A. marginale* tende a reverter este efeito através da estimulação dos genes antioxidantes (Figuras 7C e 7D).

Figura 7 - Perfil da expressão gênica das células BME26 desafiadas por diferentes microrganismos



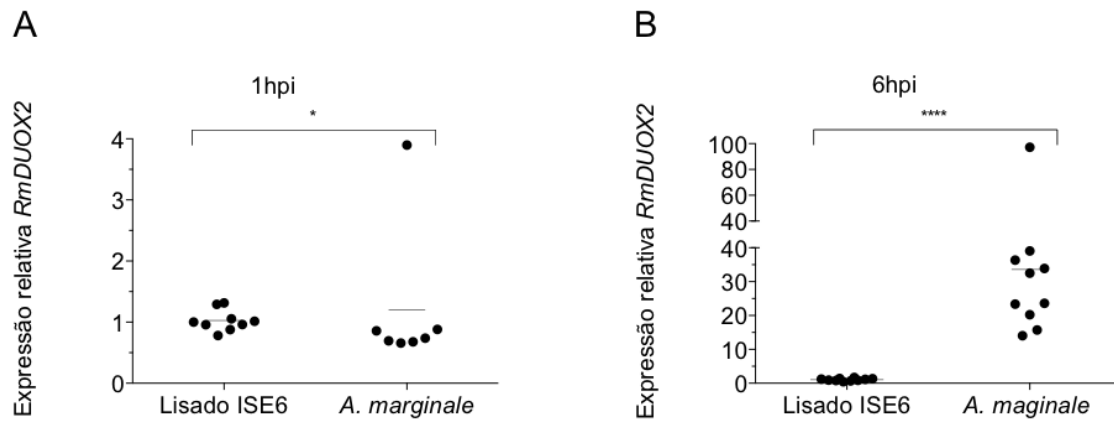
(A) Cinética de infecção das riquetsias foi avaliada por qPCR usando a sonda *TaqMan* para o gene específico de copia única *AmMSP5* de *A. marginale* e o gene da citrato sintase de *R. rickettsii* (*RrGLTA*). (B) Porcentagem de mortalidade das células BME26 avaliada por microscopia de luz através da coloração por azul de tripan.

(C, D) Perfil de expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas nas reações (i) pró-oxidantes e (ii) antioxidantes das células BME26 incubadas com *A. marginale*, *R. rickettsii*, *M. luteus*, *E. cloacae* e *S. cerevisiae*. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak, Schmittgen, 2001). A análise da expressão gênica dos experimentos de infecção das células BME26 por *A. marginale* foi realizada considerando como condição calibradora (C) células BME26 incubadas com eritrócitos e (D) células BME26, enquanto que (C) nos experimentos de incubação com *R. rickettsii* foram utilizadas células BME26 incubadas com lisado de células BME26 e com microrganismos termo-inativados *M. luteus*, *E. cloacae* e *S. cerevisiae*, células BME26. Cada célula do gráfico tipo *heatmap* corresponde ao nível de expressão de um gene em uma dada amostra (média de triplicatas biológicas), sendo que a intensidade da cor de verde a vermelho indica a magnitude da expressão diferencial dos genes. Os genes analisados foram: *RmNOS* (Oxido nítrico sintase, GenBank [CV438673]), *RmERO1* (Oxidase do retículo endoplasmático, GenBank [CV453012.1]), *RmDUOX1* (Dual oxidase 1, GenBank [CV442800.1]), *RmDUOX2* (Dual oxidase 2, GenBank [CV449552]), *RmMnSOD* (Superóxido dismutase dependente de manganês, GenBank [CV442321]), *RmCu/ZnSOD* (Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco, GenBank [CK178001]), *RmCAT* (Catalase, GenBank [CK175079]), *RmGPX* (Glutaciona peroxidase, GenBank [CV440147]), *RmGST1* (Glutaciona-S-transferase, GenBank [CK180220]), *RmGST2* (Glutaciona-S-transferase, GenBank [CK191620]), *RmGST3* (Glutaciona-S-transferase, GenBank [CK191255]), *RmGST4* (Glutaciona-S-transferase, GenBank [CK178638]), *RmTRX* (Tiorredoxina, GenBank [CK190673]), *RmTRXR* (Tiorredoxina redutase, GenBank [CV451339]), *RmPRX* (Peroxirredoxina, GenBank [CK179571]).

4.3 Perfil da expressão de genes que estão envolvidos na produção e destoxificação do H₂O₂ nas células BME26

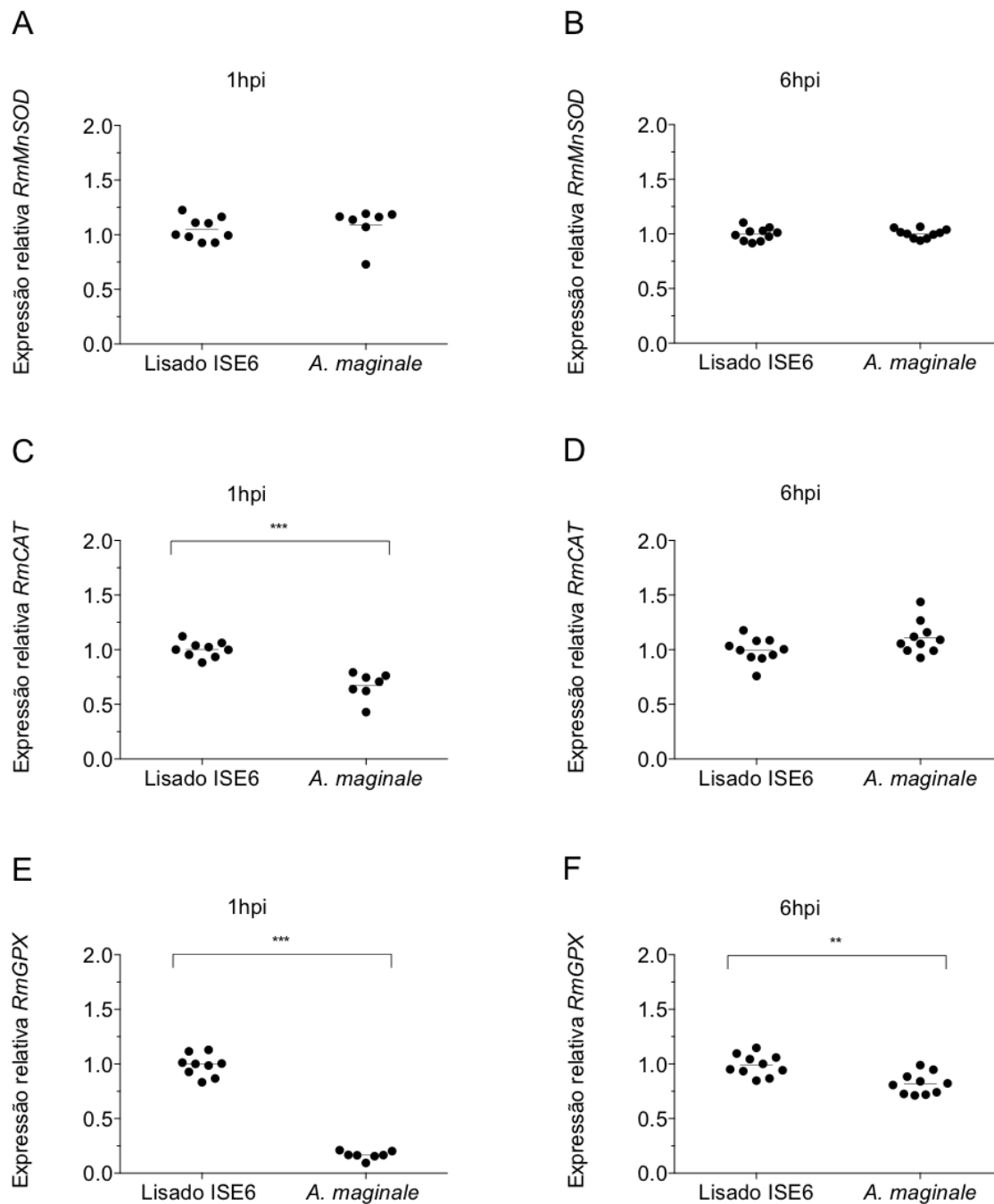
Foram quantificados os níveis de expressão por RT-qPCR do gene pró-oxidante *RmDUOX2* e dos genes antioxidantes *RmMnSOD*, *RmCAT* e *RmGPX*. Durante a primeira hora de infecção, *A. marginale* não modulou o gene *RmDUOX2* (Figura 8A). Após 6 h de infecção foi observada uma indução do transcrito do gene *RmDUOX2* em aproximadamente 20 vezes (Figura 8B). Por outro lado, o transcrito do gene antioxidante *RmMnSOD* não foi modulado em 1 e 6 h após a infecção por *A. marginale* (Figura 9A e 9B). O gene *RmCAT* foi reprimido em aproximadamente 1,5 vezes (Figura 9C) e após 6 h não foi modulado pela infecção (Figura 9D). O outro gene antioxidante analisado, *RmGPX*, apresentou um perfil semelhante ao gene *RmCAT*, sendo inibido em aproximadamente 6,6 vezes durante a primeira hora de infecção (Figura 9E) enquanto que, após 6 h de infecção, observamos uma diminuição de 1,2 vezes comparada com o controle (Figura 9F). A modulação dos genes *RmDUOX2*, *RmMnSOD*, *RmCAT* e *RmGPX* pela infecção por *A. marginale* após 6 h, confirma o resultado obtido mostrado na figura 7D. Estes resultados sugerem que *A. marginale* cria um ambiente pró-oxidante através do aumento no transcrito do gene *RmDUOX2* e com a redução ou não modulação dos transcritos da *RmMnSOD*, *RmCAT* e *RmGPX*.

Figura 8 - Perfil da expressão do gene pró-oxidante *RmDUOX2* nas células BME26 infectadas por *A. marginale*



Expressão relativa do gene *RmDUOX2* das células BME26 incubadas com lisado de células ISE6 (controle) e *A. marginale* após (A) 1h e (B) 6h. A expressão relativa do gene foi determinada por RT-qPCR e pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Os valores representam a média de sete a dez réplicas biológicas (*p= 0,04; ****p <0,0001).

Figura 9 - Perfil da expressão dos genes antioxidantes *RmMnSOD*, *RmCAT* e *RmGPX* nas células BME26 infectadas por *A. marginale*



Expressão relativa dos genes antioxidantes *RmMnSOD*, *RmCAT* e *RmGPX* das células BME26 incubadas com lisado de células ISE6 (controle) e *A. marginale*. Expressão relativa do gene *RmMnSOD* após (A) 1h e (B) 6h. Expressão relativa do gene *RmCAT* após (C) 1h e (D) 6h. Expressão relativa do gene *RmGPX* após (E) 1h e (F) 6h. A expressão relativa dos genes foi determinada por RT-qPCR e pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Os valores representam a média de sete a dez réplicas biológicas (**p= 0,0021; ***p= 0,0002).

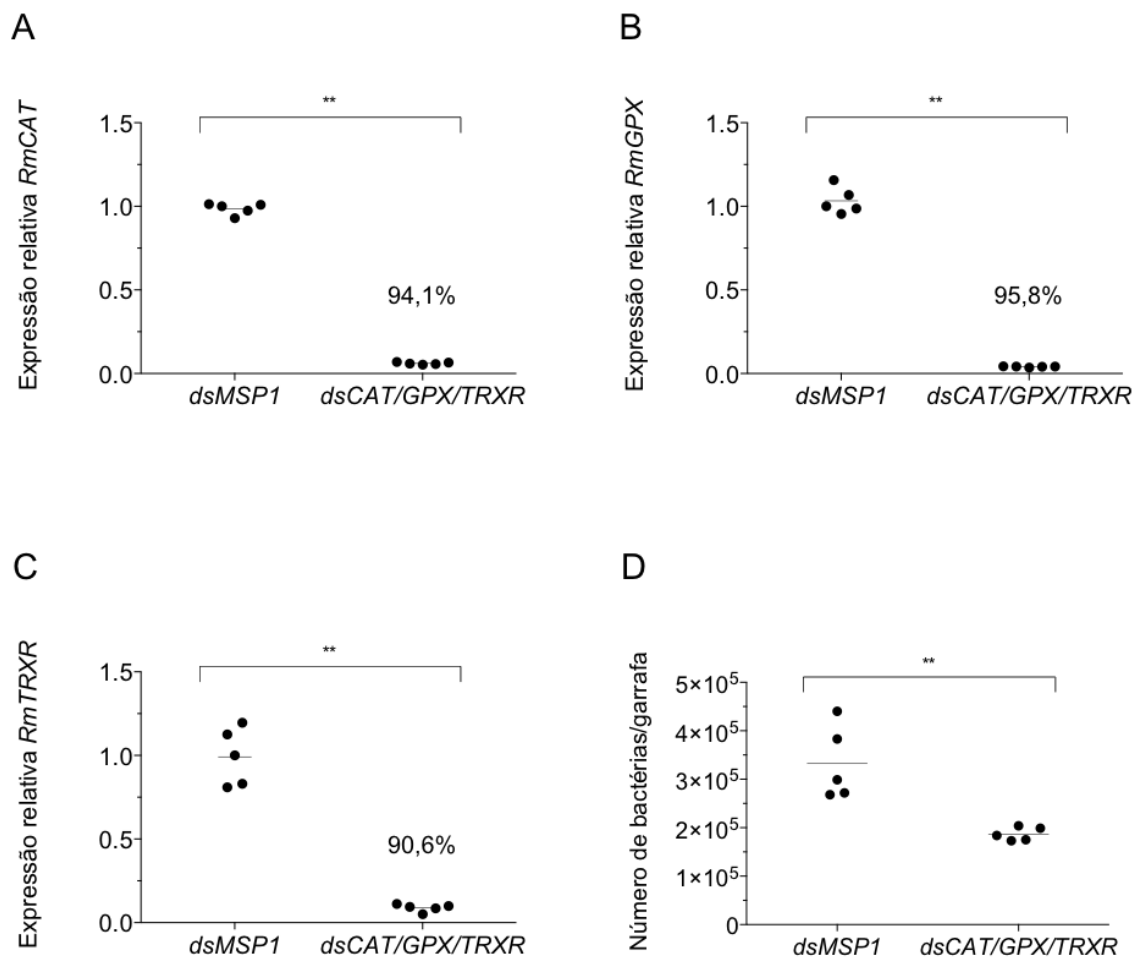
4.4 Efeito do silenciamento de genes antioxidantes na infecção de células BME26 por *A. marginale*

Uma vez observada a modulação de alguns genes antioxidantes das células BME26 infectadas por *A. marginale*, resolvemos verificar o envolvimento dos genes *RmCAT*, *RmGPX*, e *RmTRXR* no controle da infecção de *A. marginale* nas células BME26. Para isso as células BME26 foram incubadas simultaneamente com *dsCAT*, *dsGPX* e *dsTRXR* e infectadas com *A. marginale*. Foi verificado um silenciamento de 94,1% para o gene *RmCAT* (Figura 10A), 95,8% para o gene *RmGPX* (Figura 10B) e 90,6% para o gene *RmTRXR* (Figura 10C). O efeito do silenciamento dos três genes antioxidantes está mostrado na figura 10D, onde se observa uma redução de *A. marginale* em aproximadamente 2 vezes em relação ao controle (Figura 10D). Os resultados sugerem que os genes *RmCAT*, *RmGPX* e *RmTRXR* são importantes no controle da infecção de *A. marginale* nas células BME26.

Uma vez que verificamos a influência de três genes antioxidantes das células BME26 no controle da infecção de *A. marginale*, resolvemos avaliar o gene *OXR1* (do inglês, *Oxidation Resistance 1*) que regula a transcrição dos genes *GPX*, *CAT* e *SOD* em mosquitos (Jaramillo-Gutierrez et al., 2010). Inicialmente foi feita uma análise *in silico* para encontrar o gene *OXR1* de *R. microplus*. Para isso, a sequência do gene *OXR1* de *D. melanogaster* (GenBank NP_652017.1) foi usada como molde para identificar as sequências na banco de dados de *ESTs* de *R. microplus*. Este banco é do transcriptoma de tecidos do carrapato baseados na plataforma Illumina, e os resultados foram depositados no NCBI (Amostra SAMN02463641). A sequência do gene foi encontrada como *Oxidation Resistance protein* [Rm-177604] que será depositada no NCBI e chamada de *RmOXR1*. O alinhamento das sequências do gene *OXR1* de diferentes espécies de artrópodes está mostrado na figura 11. Destacamos a presença do domínio TLDC (tem demonstrado proteção contra o dano oxidativo) na extremidade carboxi-terminal de todos os genes. As sequências usadas para fazer o alinhamento foram: *mustard isoform B* de *D. melanogaster*, *nucleolar protein c7b* de *A. aegypti*, *nucleolar protein c7c putative* de *I. scapularis*, *A. gambiae* e de *R. microplus* (Rm-177604) (Figura 11). O gene *RmOXR1* codifica uma proteína de 964 aminoácidos, com uma massa molecular predita de 105.232,39 Da

e um PI teórico de 5,22. O domínio conservado de TLDC se encontra compreendido entre os AA 802 a 964 em *R. microplus* (Figura 11).

Figura 10 - Efeito do triplo silenciamento dos genes *RmCAT*, *RmGPX* e *RmTRXR* nas células BME26 infectadas por *A. marginale*

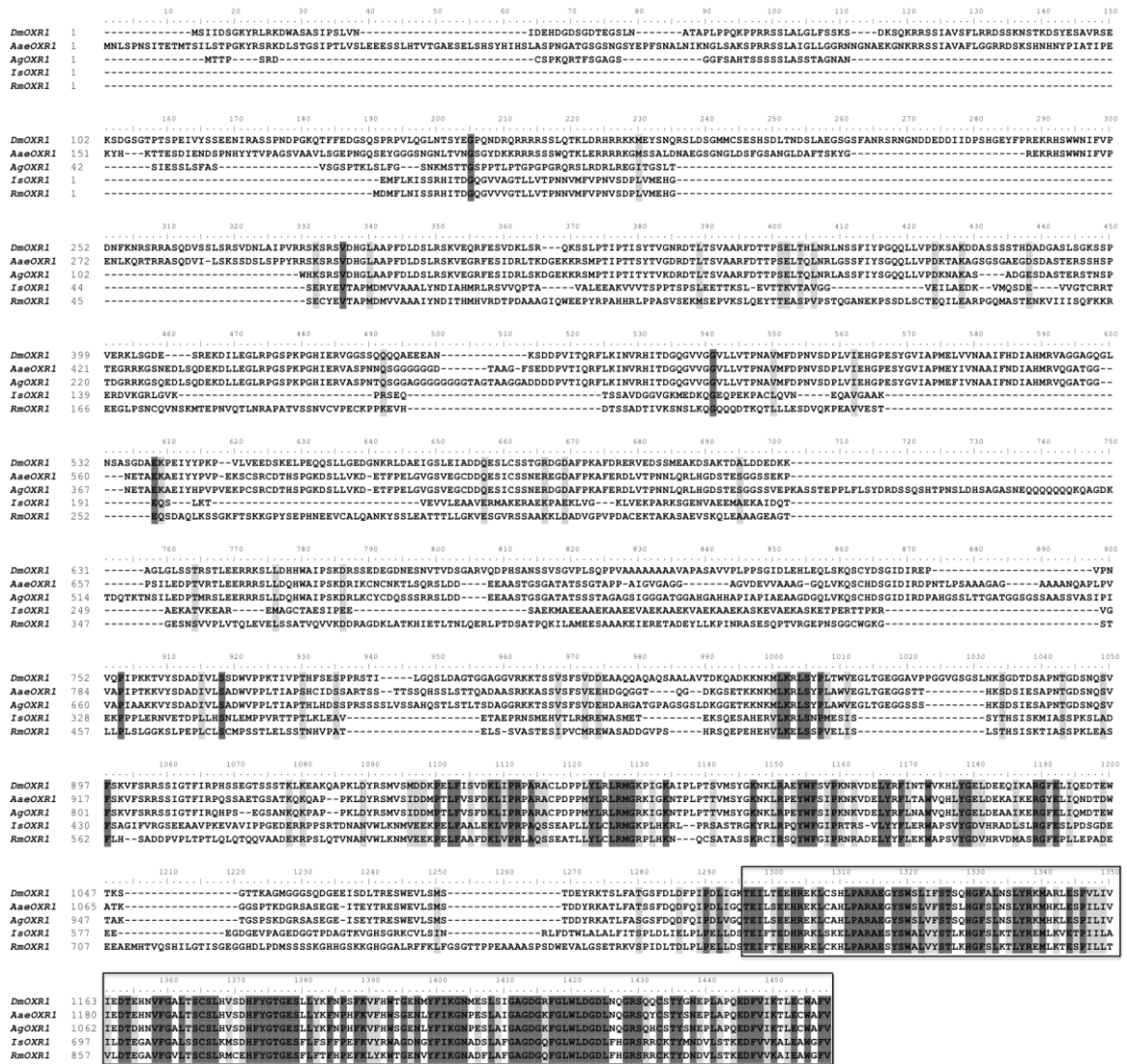


Células BME26 tratadas com *RmdsCAT*, *RmdsGPX* e *RmdsTRXR* e infectadas por *A. marginale* durante 3 dias. Expressão relativa do gene (A) *RmCAT*, (B) *RmGPX* e (C) *RmTRXR*. (D) Quantificação de *A. marginale*. A expressão relativa dos genes foi determinada por RT-qPCR e pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak, Schmittgen, 2001). O número de bactérias foi avaliado por qPCR usando a sonda *TaqMan* para o gene específico de cópia única *AmMSP5*. Como controle foi usado o gene não relacionado *PfMSP1* que codifica a proteína de superfície MSP1 em *P. falciparum*. Os valores representam a média de cinco réplicas biológicas (p**= 0,0079).

Foram desenhados os oligonucleotídeos *RmdsOXR1* para a síntese de *dsRNA* (Tabela 1) na região do domínio TLDC e posteriormente adicionada às células BME26 e infectadas com *A. marginale*. Foi verificado um silenciamento de 37,5% do gene *RmOXR1* em relação ao controle (Figura 12A) e um efeito pequeno, mas significativo na redução no nível de infecção por *A. marginale* (Figura 12B). Considerando que o gene *OXR1* modula a expressão de genes antioxidantes em *A. gambiae* (Jaramillo-Gutierrez et al., 2010), resolvemos analisar a expressão dos genes *RmMnSOD*, *RmCAT* e *RmGPX* nas células BME26 que apresentavam o gene *RmOXR1* silenciado. Verificou-se que não houve alteração da expressão dos genes *RmMnSOD* (Figura 12C) e *RmGPX* (Figura 12E), em contraste com o aumento de 0,6 vezes no nível de transcrição do gene da *RmCAT* (Figura 12D).

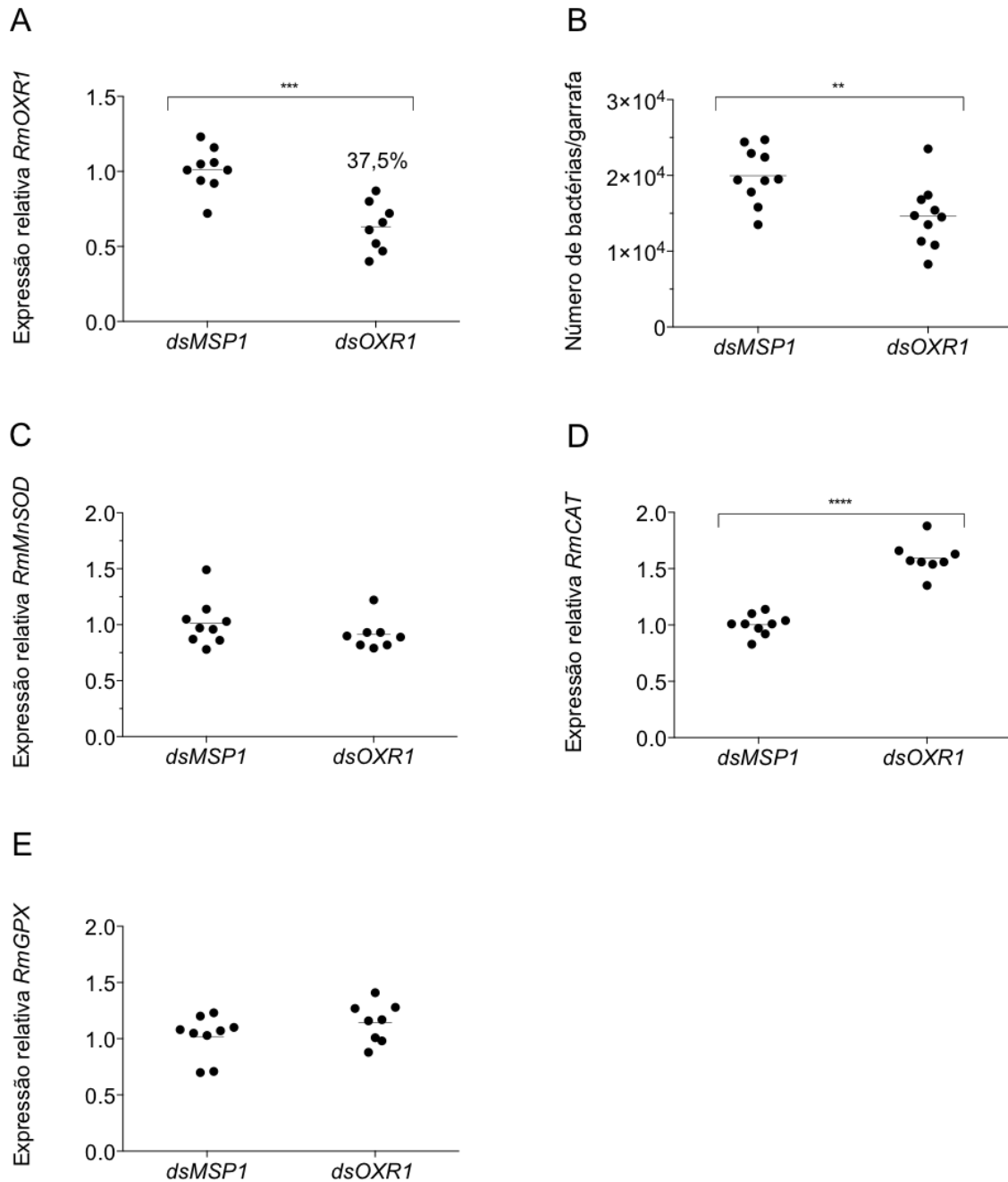
Considerando a redução da infecção nas células triplamente silenciadas para os genes *RmCAT*, *RmGPX* e *RmTRXR* e nas células com silenciamento individual para o gene *RmOXR1*, pode-se sugerir que estejam envolvidos diretamente com resposta oxidativa ou em processos de regulação de vias de sinalização, gerando um prejuízo na viabilidade de *A. marginale*.

Figura 11 - Alinhamento das seqüências da proteína OXR1 de diferentes espécies de artrópodes



D. melanogaster (Dm, GenBank [NP_652017.1]), *A. aegypti* (Aae, GenBank [XP_001662202.1]), *I. scapularis* (Is, GenBank [XP_002412512.1]), *A. gambiae* (Ag, GenBank [XP_003435918.1]), *R. microplus* [Rm: Rm-177604]. As regiões com identidade e similaridade estão marcadas em cinza escuro e claro, respectivamente. O domínio TLDC (do inglês, *TBC LysM domain containing proteins*) está assinalado pelo retângulo. Alinhamento obtido através do programa BioEdit.

Figura 12 - Efeito do silenciamento do gene *RmOXR1* nas células BME26 infectadas por *A. marginale* e na modulação da expressão dos genes *RmMnSOD*, *RmCAT* e *RmGPX*



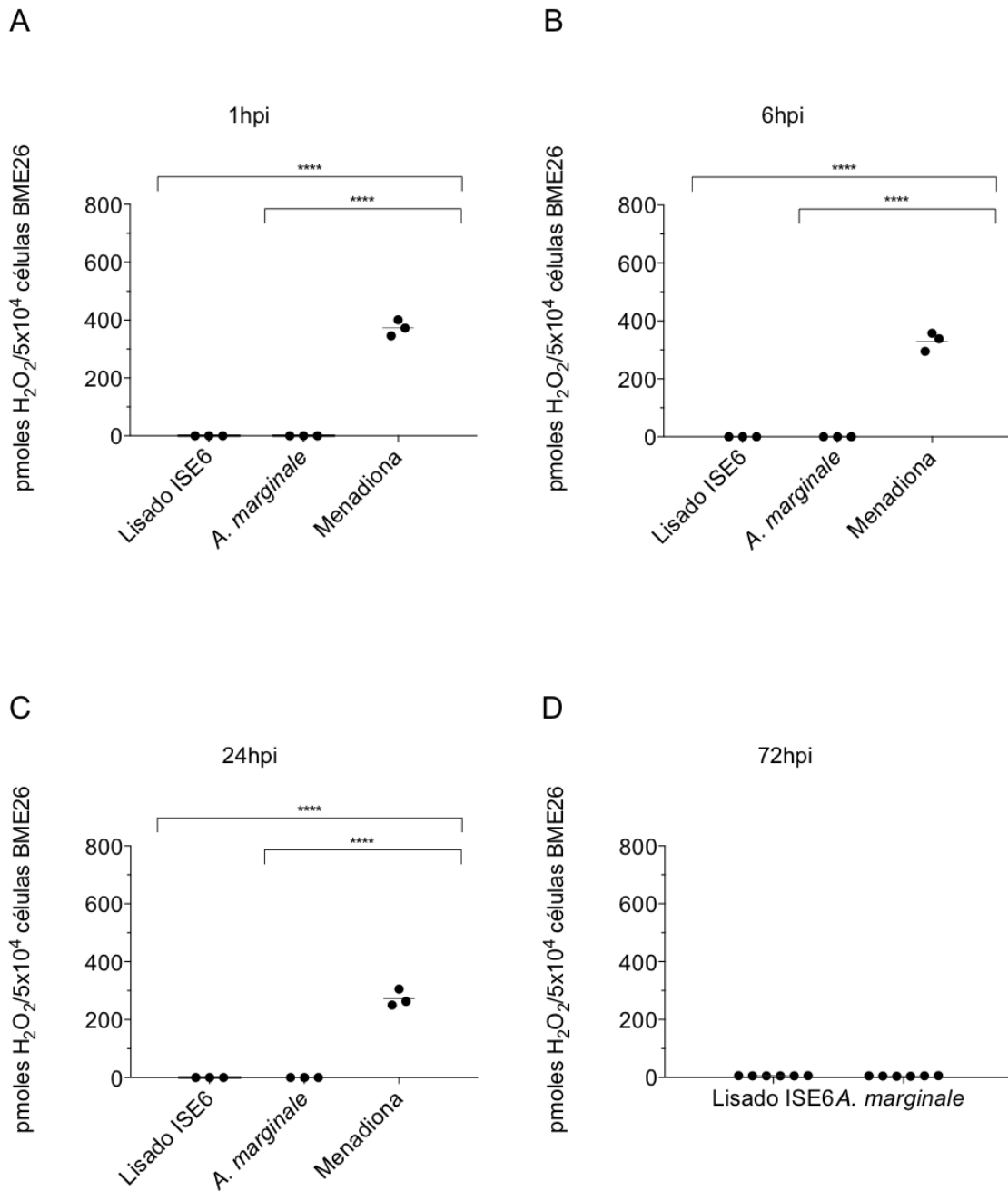
Células BME26 tratadas com *Rm*ds*OXR1* e infectadas por *A. marginale* durante 3 dias. (A) Expressão relativa do gene *RmOXR1*. (B) Quantificação de *A. marginale*. Expressão relativa do gene (C) *RmMnSOD*, (D) *RmCAT* e (E) *RmGPX*. A expressão relativa dos genes foi determinada por RT-qPCR e pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak, Schmittgen, 2001). O número de bactérias foi avaliado por qPCR usando a sonda *TaqMan* para o gene específico de cópia única *AmMSP5*. Como controle foi usado o gene não relacionado *PfMSP1* que codifica a proteína de superfície MSP1 em *P. falciparum*. Os valores representam a média de dez réplicas biológicas ($p^* = 0,0071$; $p^{***} = 0,0004$; $p^{****} < 0,0001$).

4.5 Quantificação da produção de H₂O₂ e atividade da CAT e GPX em células BME26 infectadas por *A. marginale*

Após verificar a modulação dos genes que codificam enzimas envolvidas na produção e decomposição de H₂O₂ em células infectadas por *A. marginale*, foi analisada inicialmente a produção de H₂O₂. Para isso foram infectadas as células BME26 usando o inóculo de *A. marginale* proveniente de células ISE6 e como controle, foi usado lisado de células ISE6. Paralelamente as células BME26 foram incubadas com o composto pró-oxidante menadiona que promove a produção de H₂O₂ e foi usado como controle positivo. Após 1, 6, 24 e 72 h de incubação, não foi vista diferença significativa entre a quantidade de H₂O₂ das células infectadas por *A. marginale* e seu controle (Figura 13). Por outro lado, as células BME26 incubadas com a menadiona responderam positivamente, mostrando que este composto provoca a liberação de H₂O₂ sendo detectado pela sonda *Amplex Red*. A dosagem de H₂O₂ nas células BME26 é o resultado do balanço na produção e decomposição dessa molécula. Com isto, não foi vista diferença significativa nas células BME26 infectadas em relação ao controle, apesar da indução do gene *RmDUOX2* nas 6 h de infecção (Figura 8B) e da redução dos transcritos gênicos da *CAT* em 1 h (Figura 9C) e da *GPX* em 1 e 6 h de infecção (Figura 9E e 9F).

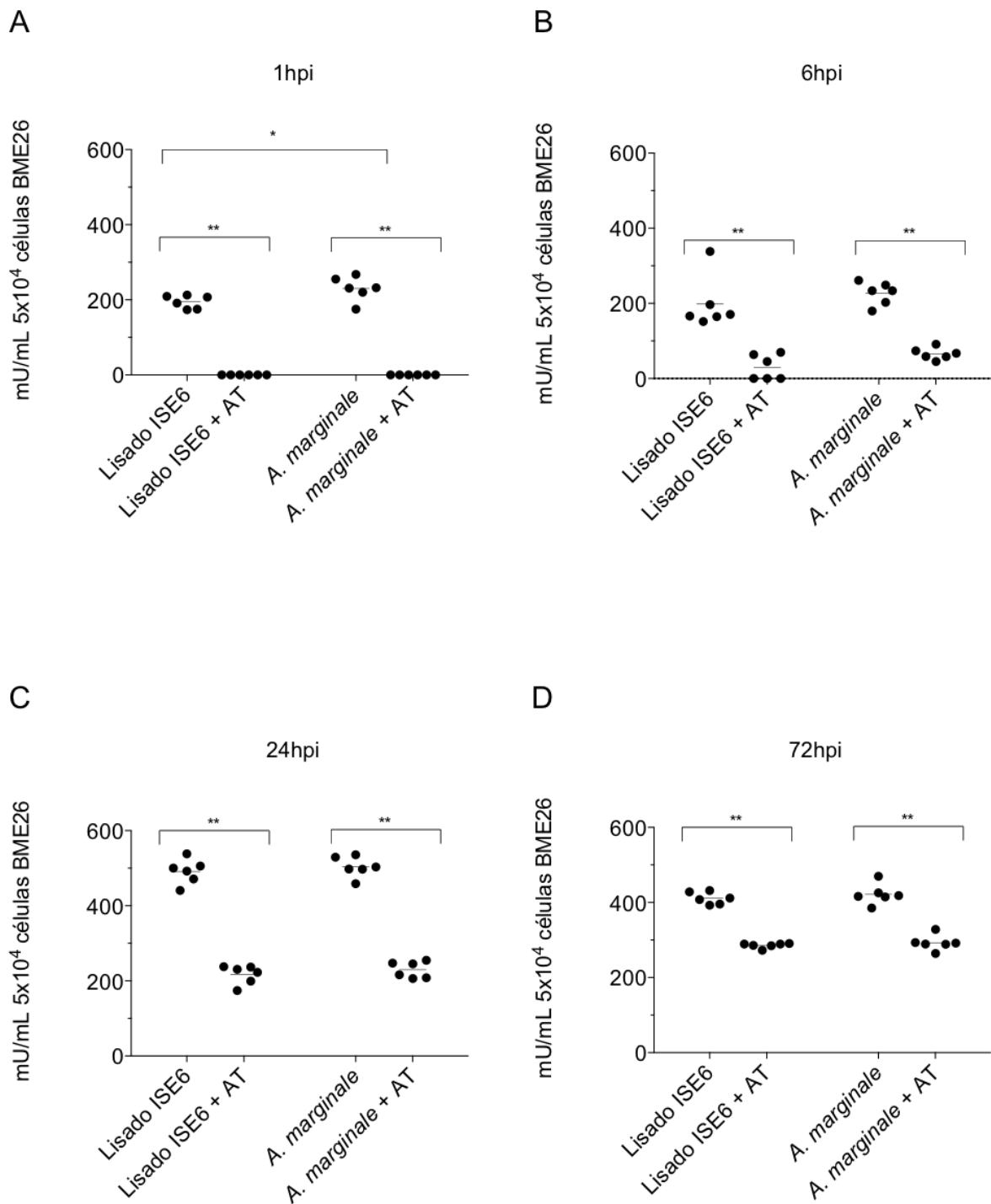
A atividade da *CAT* foi quantificada nas células BME26 incubadas por 1, 6, 24 e 72 h (Figura 14). Somente na incubação por 1 h, notou-se um aumento de aproximadamente 1,2 vezes em relação às células incubadas com lisado celular (Figura 14A). Em tempos de 6, 24 e 72 h de incubação, as atividades foram iguais entre as células infectadas e o controle (Figura 14B–D). A especificidade da reação foi verificada através da incubação dos sobrenadantes com aminotriazol, que é um inibidor específico da *CAT*, mostrando a redução da atividade enzimática na presença de AT (Figura 14). A atividade de outra enzima antioxidante, *GPX*, foi dosada nas células BME26 incubadas por 1, 6, 24 e 72 h (Figura 15A-D). Os resultados mostram que não há diferença significativa na atividade de *GPX* entre as células infectadas e as controle, apesar da diminuição da expressão do transcrito do gene *RmGPX*, verificada 1 e 6 h após a infecção (Figura 9E e 9F).

Figura 13 - Dosagem de H_2O_2 nas células BME26 infectadas por *A. marginale*



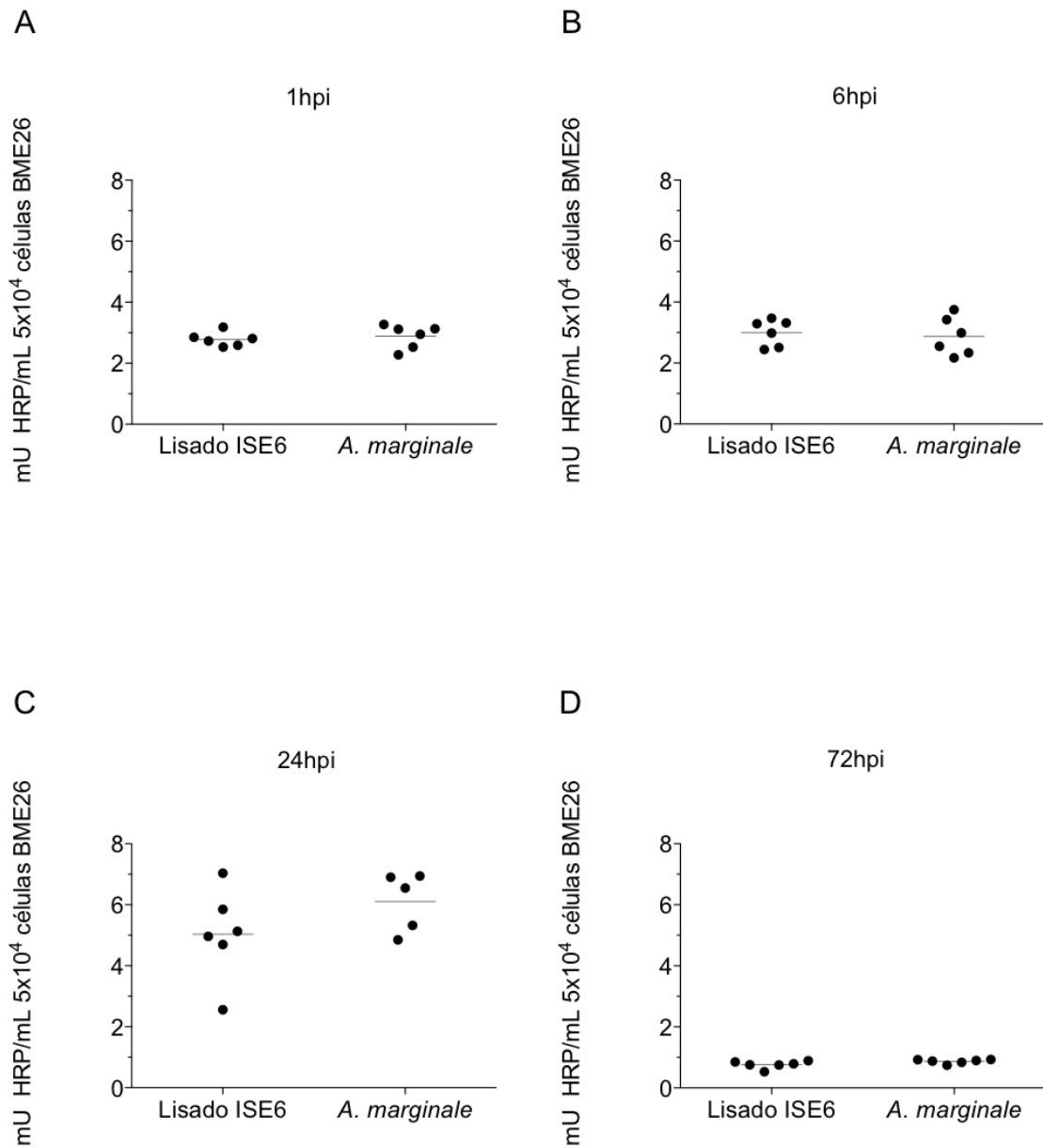
As células BME26 foram incubadas com *A. marginale*, ou lisado de células ISE6 ou o composto pro-oxidante menadiona por (A) 1h, (B), 6h, (C) 24h e (D) 72h. Os sobrenadantes das células BME26 após a incubação foram utilizados para a dosagem de H_2O_2 através da sonda *Amplex Red*. Os valores representam a média de três a seis réplicas biológicas. Foi usado o teste estatístico *Mann-Whitney* (****p= >0,0001).

Figura 14 - Dosagem da atividade da CAT intracelular nas células BME26 infectadas por *A. marginale*



As células BME26 foram incubadas com *A. marginale*, ou lisado de células ISE6 ou inibidor aminotriazol por (A) 1h, (B), 6h, (C) 24h e (D) 72h. Os lisados das células BME26 após a incubação foram utilizados para a dosagem de atividade da CAT através da sonda *Amplex Red*. Os valores representam a média de seis réplicas biológicas. Foi usado o teste estatístico *Mann-Whitney* ($p^* = 0,0022$; $p^{**} = 0,0411$).

Figura 15 - Dosagem da atividade da GPX intracelular nas células BME26 infectadas por *A. marginale*



As células BME26 foram incubadas com *A. marginale* ou lisado de células ISE6 por (A) 1h, (B) 6h, (C) 24h e (D) 72h. Os lisados das células BME26 após a incubação foram utilizados para a dosagem de atividade de GPX através da sonda *Amplex Red*. Os valores representam a média de seis réplicas biológicas. Foi usado o teste estatístico *Mann-Whitney*

5 DISCUSSÃO

5.1 Infecção das células BME26 por *A. marginale*

A linhagem celular BME26 foi caracterizada previamente por nosso grupo de pesquisa (Esteves et al., 2008) pela utilização de microscopia eletrônica e de luz e por técnicas moleculares. Os resultados demonstraram que as células BME26 apresentam diversas características relacionadas ao sistema imune, como, por exemplo, atividade de fagocitose e expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas em diferentes reações imunes, tais como ferritina, serina proteinases, inibidor de proteases, GST, peroxidases, NADPH oxidases e PAM (microplusina e defensina). A linhagem BME26 foi estabelecida a partir de embriões do carrapato *R. microplus* e contém predominantemente dois tipos celulares, os quais diferem um do outro em tamanho e granulosidade. Em experimentos posteriores, a infecção e a propagação de *A. marginale* nessa linhagem foram estabelecidas. Foram observadas pequenas colônias a partir do oitavo dia da adição do inóculo através da coloração por Panóptico e observação das células por microscopia de luz. Um nível de infecção de 15 a 20% das células foi detectado no vigésimo dia de cultivo (Esteves et al., 2009).

No presente estudo, a cinética de crescimento de *A. marginale* em células BME26 foi reavaliada, determinando-se o porcentual de infecção das células por microscopia de fluorescência e eletrônica e da quantificação das bactérias por métodos moleculares. Verificou-se que o porcentual de infecção nas células aumenta gradativamente ao longo do cultivo, atingindo o máximo de 23% aos 21 dias, conforme previamente descrito por Esteves et al. (2009). No entanto, o número de bactérias nas células BME26 ao longo dos 21 dias de infecção não segue o mesmo perfil do porcentual de infecção das células. Observou-se um aumento no número de bactérias ao longo dos três primeiros dias, com uma redução de cerca de 4 vezes aos 21 dias (Figura 4A). Além disso, verificou-se que a infecção por *A. marginale* não gera um prejuízo às células, visto que essas apresentam uma baixa taxa de mortalidade (menor que 10%) (Figura 4B). Também não se evidenciou alteração na taxa de crescimento das células em relação àquelas sem infecção (dados não mostrados). Portanto, o conjunto de resultados apresentados sugere que as células BME26 apresentam um controle sobre a infecção por *A. marginale*. Em

estudos realizados com *A. marginale* (cepa Virginia) observou-se uma variabilidade da taxa de infecção em diferentes linhagens celulares por microscopia de luz após a coloração por Panóptico (Chávez et al., 2012). Nas células ISE6 e IDE12 (células embrionárias derivadas de *I. scapularis*), as taxas de infecção foram superiores a 78% após 12 dias de infecção, em células BME26 foi de quase 50% e em células Vero (células epiteliais derivadas dos rins do macaco verde, *Cercopithecus* sp) foi aproximadamente 30% de infecção. A taxa maior de infecção das células ISE6 e IDE12 em relação às BME26 pode ser explicada pelo fato de *I. scapularis* não ser o vetor natural de *A. marginale*. No entanto, o nível de infecção das células BME26 detectado nesse trabalho é cerca de três vezes maior do obtido em nosso laboratório (50% versus 16% em 12 a 14 dias pós-infecção). Esse resultado poderia ser explicado pela diferença de cepa de *A. marginale* e/ou componentes do meio de cultivo utilizados pelos dois grupos de pesquisa. Além disso, consideramos que a técnica de coloração por Panóptico apresenta uma certa imprecisão, uma vez que as vesículas das células BME26 (Esteves et al, 2008) também são coradas por esse corante, confundindo-se com os vacúolos parasitóforos que abrigam as colônias de *A. marginale*. Assim, nosso grupo de pesquisa adotou a quantificação das bactérias por qPCR como protocolo de avaliação da infecção.

Uma vez tendo a cinética de infecção da *A. marginale* nas células BME26 sido estabelecida, foi necessário conhecer o processo de invasão dessas células pelas bactérias. Inicialmente utilizou-se *A. marginale* GFP. No entanto, a microscopia de fluorescência permitiu evidenciar a presença da bactéria dentro das células somente a partir do sétimo dia de infecção (Figura 5D-5F), quando as colônias estão maiores. A dificuldade em se detectar a fluorescência da GFP foi devida à intensa autofluorescência das células BME26. Para suprimir essa autofluorescência, alteramos o protocolo de preparação das células, como fixação com metanol e incubação com azul de Evans, o que trouxe um prejuízo para visualizar as bactérias durante os três primeiros dias de infecção (Figura 5B e 5C). Nos experimentos realizados com essa linhagem recombinante, Felsheim et al. (2010) também observaram uma intensa autofluorescência das células ISE6, utilizadas como células hospedeiras. Posteriormente Noh et al. (2011), demonstraram a infecção de *A. marginale* GFP no carrapato *D. andersoni*. A autofluorescência dos tecidos do

carrapato pareceu não ser um impedimento na análise da infecção por *A. marginale* GFP, uma vez que a fluorescência das colônias era bem intensa, devido provavelmente ao grande número de bactérias presentes nas mesmas. Essa linhagem recombinante mostrou o mesmo perfil de infecção que o observado para a cepa selvagem, porém apresentou um tempo de duplicação mais lento (Noh et al., 2011).

Uma vez que não foi possível visualizar *A. marginale* GFP nas células BME26 em tempos menores que 7 dias, resolveu-se analisar a invasão por microscopia eletrônica de transmissão. Observou-se na primeira hora após a exposição, bactérias aderidas na superfície celular e dentro das células (Figura 6).

Blouin e Kocan (1998) mostraram que o processo de invasão de *A. marginale* nas células IDE8 é similar com observado no presente estudo para as células BME26. As bactérias com um tamanho aproximado de 0,5 μm a 0,8 μm foram visualizadas invadindo as células hospedeiras ou no interior do vacúolo parasitóforo, após 15 minutos de exposição aos patógenos. Foram observadas diversas projeções da plasmalema engolfando as bactérias aderidas em diferentes pontos da membrana plasmática. Blouin e Kocan (1998) observaram também as duas formas distintas das colônias: a forma reticulada que se multiplica por fissão binária e a forma densa ou infectante. Curiosamente, assim como foi mostrado na figura 6E, esses autores observaram vacúolos parasitóforos extracelulares contendo vesículas e numerosas colônias densas de *A. marginale*, as quais são provavelmente provenientes do inóculo. Após quatro dias de infecção, os autores observaram vacúolos parasitóforos muito próximos ao plasmalema das células IDE8, em um processo de fusão com a membrana celular, evitando dessa forma a lise das células.

Os resultados obtidos até aqui, comprovando a entrada de *A. marginale* em 1 h após a infecção e o estabelecimento da bactéria em tempos posteriores nas células BME26, nos deram suporte para avaliar os efeitos da infecção em tempos curtos como em tempos mais longos.

5.2 Perfil transcriptômico de genes envolvidos na produção e destoxificação das ERO e ERN

O sequenciamento completo do genoma de diversos artrópodes-vetores é um grande avanço para o conhecimento da biologia do vetor, além de promover o uso da genômica funcional e genômica reversa. O desenvolvimento das linhagens celulares isoladas de vetores também foi de extrema importância e facilitaram o estudo da interação parasita-vetor, propiciando a identificação de moléculas que medeiam a viabilidade e multiplicação dos patógenos. O genoma de *R. microplus* ainda não foi sequenciado e se estima um tamanho aproximado de 7,1 Giga pares de bases (Gpb) contendo cerca do 70% em DNA repetitivo (Ullmann et al., 2005). Apesar disso, ferramentas biológicas estão disponíveis para facilitar o projeto do sequenciamento do genoma, dentre elas a criação de colônias de carrapatos em laboratório e bases de dados de *EST* compiladas no NCBI. Adicionalmente, o genoma recentemente publicado de *I. scapularis* (Nuss et al., 2016) permitirá explorar e inferir diversas informações sobre *R. microplus*.

Apesar de serem considerados importantes vetores de patógenos para animais e humanos, pouco é conhecido sobre o sistema imune de carrapatos, principalmente sobre o estresse oxidativo. A grande maioria de informação disponível sobre o estresse oxidativo como resposta à invasão de patógenos encontrada, é disponível para *Drosophila* (Ha et al., 2005) e mosquitos (Jaramillo-Gutierrez et al., 2010; Molina-Cruz et al., 2008).

Com o objetivo de entender a resposta global de *R. microplus* frente a diferentes desafios microbianos e, dessa forma, preencher a lacuna existente da literatura, selecionamos genes relacionados com a resposta pró-oxidante e antioxidante do estresse oxidativo. A expressão gênica diferencial desses genes nas células BME26 expostas ou não aos desafios microbianos foi determinada por RT-qPCR em larga escala. Foram utilizados microrganismos que são transmitidos por carrapatos, sendo uma riquetsia (*A. marginale*) transmitida por *R. microplus* e outra (*R. rickettsii*) transmitida por outras espécies de carrapatos (Chapman et al, 2006).

Adicionalmente, foram utilizados os seguintes microorganismos não patogênicos termo-inativados: *M. luteus* (bactéria Gram-positiva), *E. cloacae* (Gram-negativa) e *S. cerevisiae* (levedura). Os resultados obtidos mostraram que as células BME26 respondem de forma diferente às duas riquetsias utilizadas, as quais, por sua vez, também apresentam perfis de infecção diferentes. O número de *A. marginale* se manteve constante ao longo dos três primeiros dias de infecção e a porcentagem de mortalidade das células BME26 foi menor que 20%, enquanto o número de *R. rickettsii* aumentou cerca de duas ordens de grandeza em relação ao inóculo inicial. A maior taxa de mortalidade das células BME26 infectadas com *R. rickettsii* não pode ser atribuída diretamente ao inóculo inicial, uma vez que o número de *A. marginale* no inóculo inicial é cerca de uma ordem de grandeza maior que o de *R. rickettsii*. No entanto, pode ser resultado da intensa taxa de proliferação desta bactéria, utilizando para tal as reservas das células hospedeiras, ou até a fatores de virulência secretados por *R. rickettsii*. Em relação à modulação gênica, *A. marginale* promoveu a formação de um ambiente aparentemente benéfico para sua sobrevivência, inibindo os genes pró-oxidantes e induzindo os genes antioxidantes das células BME26 (Figura 7C). Contrariamente, observou-se de uma forma geral que *R. rickettsii* provocou uma menor inibição dos genes pró-oxidantes e uma menor indução dos genes antioxidantes (Figura 7C). Apesar de um ambiente aparentemente mais pró-oxidante, houve um maior crescimento de *R. rickettsii* em comparação com *A. marginale*, mas com prejuízo da morte celular das células BME26 (Figura 7A e Figura 7B). Já foi demonstrado que genes antioxidantes de *R. rickettsii* são induzidos quando a bactéria é exposta à ambientes oxidativos, como a alimentação sanguínea (Galletti et al., 2013), o que pode justificar o seu crescimento em células BME26. Também é plausível supor que a modulação gênica diferencial seja resultado da coevolução de *R. microplus* e *A. marginale*, a qual pode manipular a maquinaria da célula hospedeira em seu próprio benefício, ativando uma resposta antioxidante.

Em células epiteliais humanas, *R. rickettsii* promove o aumento na produção de ERO ocasionando morte celular (Rydkina et al., 2002; Silverman, Santucci, 1988). Segundo Silverman e Santucci (1988), a morte celular deve ser devida ao aumento da permeabilidade da membrana interna das células, fenômeno similar ao reportado

em sistemas sofrendo peroxidação lipídica. Essa hipótese é reforçada por dois fatores: (i) o incremento de H_2O_2 nas células infectadas, que na reação com o radical $O_2^{\cdot-}$, permitiria o aumento na formação do radical OH^{\cdot} iniciando o processo de peroxidação lipídica; (ii) o radical OH^{\cdot} presente interage com o carbono de metileno dos ácidos graxos polienóicos, separando o enlace duplo e permitindo a formação de LOOH (Silverman, Santucci, 1988). Por outro lado, o NO^{\cdot} parece não ter um papel importante na linhagem celular humana na infecção por *R. rickettsii* (Hong et al., 1998).

O perfil global da transcrição gênica obtido pelo desafio com os microrganismos termo-inativados é similar entre eles, mostrando uma indução dos genes pró-oxidantes ao longo da infecção e reprimindo levemente os genes antioxidantes. Adicionalmente, esses resultados sugerem que a modulação da resposta oxidativa na linhagem BME26 não discriminou entre os diferentes desafios de microrganismos inativados (bactéria Gram-positiva, Gram-negativa ou levedura), mesmo considerando os diferentes padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) de cada um. De modo geral, os resultados mostrados até aqui evidenciam uma clara diferença no perfil de expressão dos genes pró-oxidantes e antioxidantes das células BME26 frente aos diferentes desafios microbianos.

O sucesso na sobrevivência dos animais hematófagos é o resultado de mecanismos de adaptação desenvolvidos por eles, a fim de minimizar as consequências derivadas da digestão do heme (Graça-Souza et al., 2006; Paes et al., 2001). A estratégia para eliminar o prejuízo causado pelo grupo heme em artrópodes hematófagos foi mostrada em *Ae. aegypti*. Quando o mosquito é alimentado com açúcar, os níveis de ERO como radical $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , são significativamente maiores que em mosquitos alimentados com sangue. Foi proposto que na presença da hemoglobina, o mosquito ‘desliga’ a produção de ERO no intestino, mediante a ativação da via PKC, para evitar a resposta oxidativa mediada pelo grupo heme, demonstrando ser uma excelente estratégia de adaptação que diminui a toxicidade na digestão da hemoglobina (Oliveira et al., 2011). Contrário ao descrito por Oliveira et al. (2011), observou-se a indução dos genes pró-oxidantes e a inibição dos genes antioxidantes pelo sangue bovino no período analisado de 72 h nas células BME26 (Figura 7D). No entanto, a infecção por *A. marginale* tende a

reverter este efeito, através da estimulação dos genes antioxidantes que deve ser fundamental para a sua sobrevivência (Figura 7C e Figura 7D). Outro gene pró-oxidante, codificador da NADPH oxidase, foi avaliado por RT-qPCR em larga escala, não tendo sido observada a sua amplificação. Acreditamos que foi um problema da reação do RT-qPCR, uma vez que o transcrito gênico foi detectado em amostras de *R. microplus* (ovos, larvas e fêmeas adultas) usados como controle (Dados não mostrados).

A análise da modulação de alguns genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo foi realizada utilizando-se um inóculo de *A. marginale* produzido em células de carrapato (ISE6) e não em eritrócitos bovinos. Além disso, o número de réplicas biológicas foi aumentado para dez, em vez das três amostras utilizadas na plataforma multifluídica (Fluidigm), possibilitando fazer uma análise estatística mais robusta. Os resultados obtidos confirmam aqueles mostrados na Figura 7D (*A. marginale*), na qual a análise foi feita com células BME26 livres como condição calibradora. A infecção após 6 horas, resulta na indução do transcrito da *RmDUOX2* (Figura 8B) e a não modulação dos transcritos dos genes antioxidantes *RmMnSOD* (Figura 9B), *RmCAT* (Figura 9D) e *RmGPX* (Figura 9F).

Poucos estudos relatam a presença de defesas antioxidantes como resposta à infecção por *A. marginale* em carrapatos. Alguns trabalhos mostraram que esta bactéria modula o gene da *GST* em *I. scapularis* (de la Fuente et al., 2007), cujo produto proteico está relacionado à destoxificação de xenobióticos e reparo de macromoléculas oxidadas por ERO (Sheehan et al., 2001). O trabalho de la Fuente et al. (2007) mostrou que em células IDE8, o transcrito da *GST* é induzido após a infecção por *A. marginale*. Após confirmar a modulação gênica, esse grupo de investigadores observou o papel funcional desse gene em *D. variabilis* mediante silenciamento gênico, evidenciando uma queda no número de *A. marginale* no intestino após a alimentação e nas glândulas salivares. Posteriormente, Bifano et al. (2014) observaram que o gene *GST* também é induzido em células BME26 infectadas por *A. marginale* mas seu silenciamento por RNAi não ocasionou diminuição no número de bactérias no intestino, diferentemente do observado em *D. variabilis*. Estas diferenças podem ser atribuídas às diferentes cepas de *A. marginale* utilizadas, assim como às diferentes espécies de vetores (Bifano et al., 2014).

Interessantemente, o padrão de transcrição dos quatro genes da *GST* nas células BME26 infectadas por *A. marginale* (Figura 7C) foi similar ao observado nas células IDE8 (de la Fuente et al. 2007). Os quatro genes analisados de *R. microplus* estão classificados como membros das classes Delta e Épsilon (*RmGST1* e *RmGST2*) e classe Mu de mamíferos (*RmGST3* e *RmGST4*), de acordo com a classificação proposta por Ranson et al. (2002). As classes Delta e Épsilon estão relacionadas com a resistência a inseticidas piretróides (Lumjuan et al., 2011) e destoxificação do aldeído 4-hidroxinonenal, que é altamente reativo e é produto do processo de peroxidação lipídica (Sawicki et al., 2003). A *GST* caracterizada em *R. microplus* está associada à exposição e resistência de acaricidas (He et al., 1999) e possui uma homologia de no mínimo 50% com a classe Mu de mamíferos e mais divergente das *GSTs* de insectos (relacionada à classe Theta).

5.3 Os genes antioxidantes são importantes para a manutenção da viabilidade de *A. marginale* nas células BME26

O silenciamento dos genes antioxidantes *RmCAT*, *RmGPX* e *RmTRXR* leva a uma diminuição no número de *A. marginale* em células BME26 após três dias de infecção (Figura 10), mostrando a importância dos mesmos na manutenção da viabilidade da bactéria. Esse mesmo fenótipo foi visto em *A. aquasalis* infectado com *P. vivax*. A redução no transcrito do gene da *CAT* em *A. aquasalis* leva a um incremento na infecção e prevalência de *P. vivax* e adicionalmente, uma diminuição na microbiota natural do intestino. A diminuição das bactérias comensais pode ser devido a um incremento das ERO após o silenciamento do gene *CAT* e inibição específica da atividade enzimática. Portanto, o silenciamento gênico e a inibição de uma das enzimas mais importantes do sistema de destoxificação de ERO, a catalase, estimula o desenvolvimento de *P. vivax*, reduz a microbiota do mosquito e inibe a via JAK/STAT para promover o desenvolvimento do patógeno no mosquito (Bahia et al., 2013).

Considerando as diversas enzimas antioxidantes que usam o H_2O_2 como substrato, sugere-se que o sistema de destoxificação seja redundante, existindo um

fenômeno de compensação. Este fato foi comprovado em camarões por Wang et al. (2012), mostrando que altas doses de H_2O_2 induzem a transcrição gênica da *GPX* e *CAT*, confirmando que estas duas enzimas são importantes na eliminação de H_2O_2 neste organismo. Por outro lado, a presença de H_2O_2 não modulou os níveis dos transcritos da *PRX*, possivelmente pela abundância desta proteína na célula (1-10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína solúvel). Quando silenciado o gene da *CAT*, os transcritos da *GPX* e *PRX* foram induzidos e, da mesma forma, com o silenciamento da *GPX*, os transcritos da *CAT* e *PRX* foram igualmente induzidos. Com base nesses resultados, os autores inferem que a expressão destes três genes antioxidantes poderia ter um efeito compensatório para manter a homeostasia nas células do camarão.

Em *I. scapularis*, foi mostrado que o sistema peroxidase/DUOX favorece a sobrevivência de *B. burgdorferi* no intestino, evitando a ativação de genes relacionados com o sistema imune (Yang et al., 2014), assim como verificado em mosquitos (Kumar et al., 2010). Adicionalmente, em resposta ao silenciamento da *DUOX* e da *peroxidase*, o transcrito da *NOS* é induzido, refletindo no aumento na produção de NO^* e na redução de *B. burgdorferi* (Yang et al., 2014).

Outro gene envolvido na regulação redox, *RmOXR1*, promoveu uma diminuição da população de *A. marginale* nas células BME26 após três dias de infecção, quando silenciado por RNAi (Figura 12B). Esse efeito na viabilidade do parasita, foi recentemente demonstrado em *A. gambiae* e está associado à regulação de enzimas antioxidantes, resultando no aumento na produção de H_2O_2 no mosquito (Jaramillo-Gutierrez et al., 2010). Em mosquitos, o transcrito reduzido do gene *OXR1*, leva a uma diminuição de oocistos de *P. berghei* em aproximadamente sete vezes, como consequência da inibição dos genes da *CAT* e *GPX*, permitindo o incremento de H_2O_2 na hemolinfa do mosquito. Esses autores também mostraram que o fator de transcrição da via JNK age a montante do gene *OXR1* e que o silenciamento deste fator causa uma redução na expressão dos genes *OXR1*, *CAT* e *GPX*. Entretanto, observou-se inesperadamente um aumento de oocistos de *P. berguei*, sugerindo que o fator de transcrição da via JNK pode também mediar uma resposta antiparasitária, cujo efector ainda é desconhecido (Jaramillo-Gutierrez et al., 2010).

Em contraste com os resultados obtidos por Jaramillo-Gutierrez et al. (2010), não se observou modulação negativa dos genes antioxidantes SOD, GPX e CAT nas células BME26 infectadas por *A. marginale* após o silenciamento do *RmOXR1* (Figura 12C-E). No entanto, a importância biológica deste gene na manutenção de *A. marginale* em BME26 foi demonstrada (Figura 12A e 12B). Considerando a similaridade dos fenótipos, sugere-se que a redução do transcrito do gene *RmOXR1* possa ter um efeito similar ao descrito por Jaramillo-Gutierrez et al. (2010), apesar de não ter sido dosado H_2O_2 nas células em que o gene *RmOXR1* foi silenciado. Além disso, ainda não conhecemos a relação entre o gene *OXR1* e a via JNK. Assim, seria interessante investigar como ocorre a regulação em *R. microplus*. A função de proteção do gene *OXR1* também foi demonstrada em *S. cerevisiae* e no homem. Volkert et al. (2000) comprovaram que em leveduras com o transcrito reduzido do gene *OXR1*, apresentam uma maior susceptibilidade ao H_2O_2 (cerca de 10 vezes) em comparação com leveduras selvagens. Posteriormente, Elliot e Volkert (2004) corroboraram a hipótese de que esse gene está envolvido na resposta ao estresse especificamente por H_2O_2 . Yang et al. (2014) também demonstraram a modulação da expressão gênica da *GPX2* e *HEME-OXIGENASE 1* na linhagem celular humana HeLa pelo silenciamento do gene *OXR1*. Da mesma forma que em levedura, o gene *OXR1* nas células HeLa é induzido após tratamento com H_2O_2 , e sendo a proteína exportada ao citoplasma da célula (Elliott, Volkert, 2004).

O gene *OXR1* também está relacionado com doenças degenerativas no sistema nervoso central de camundongos (Liu et al., 2015). Em camundongos com o silenciamento do gene *OXR1*, ocorre acúmulo de H_2O_2 , que está relacionado com a neurodegeneração e perda do controle muscular. Da mesma forma que em *A. gambiae*, o silenciamento do gene *OXR1* também promove a inibição da *GPX1* (Oliver et al., 2011). Interessantemente, este grupo de investigadores concluíram que a extremidade carboxi-terminal do domínio TLDC da proteína *OXR1* é suficiente para conferir proteção contra o estresse oxidativo. Considerando este fato, a extremidade carboxi-terminal do domínio TLDC pode reagir diretamente com o H_2O_2 *in vitro*. Esta interação é realizada via oxidação da cisteína (Cys753) do sítio ativo. Apesar da propriedade antioxidante, a proteína *OXR1* possui uma constante de velocidade ($0,82 M^{-1}.s^{-1}$) milhares de vezes menor que a de antioxidantes clássicos

como a CAT e PRX que possuem constantes superiores a $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Portanto, apesar da função antioxidante da OXR1, é provável que a sua atividade esteja mais relacionada com um papel de regulação e não como um ligante de H_2O_2 (Oliver et al., 2011).

5.4 A. *marginale* não induz a produção de H_2O_2 e não modula a atividade das enzimas CAT e GPX na linhagem celular BME26

Através da análise de dados de expressão gênica obtidos por RT-qPCR (Figura 7C - 7D, Figura 8 e Figura 9) pode se observar que a infecção por *A. marginale* modula a expressão de genes pró-oxidantes e antioxidantes. Apesar disto, observamos que *A. marginale* não induz a produção de H_2O_2 nas células infectadas durante 1 h nem em tempos tardios de infecção. Entretanto, o estímulo com menadiona promoveu uma abundante liberação de H_2O_2 na célula (Figura 13).

O H_2O_2 é a ERO com maior tempo de vida média (10^{-5} s) e é considerada a mais abundante nas células, atingindo concentrações de 10^{-7} M (Giorgio et al., 2007). O H_2O_2 possui um coeficiente de permeabilidade similar ao da água o que faz com que tenha a capacidade de atravessar as camadas lipídicas das células (Imlay, 2009). A concentração de H_2O_2 no interior de qualquer compartimento celular depende da taxa do influxo e/ou da formação endógena, e balanceada com as taxas de decomposição e efluxo da mesma. Adicionalmente o trânsito de H_2O_2 através das membranas parece ser tão rápido, que o efluxo dessa molécula para o meio extracelular acontece antes de que enzimas como a catalase e peroxidase possam eliminá-la (Seaver, Imlay, 2001).

Existe pouca informação acerca da resposta oxidativa em carrapatos frente a infecções. Pereira et al. (2001) foram os primeiros a demonstrar a produção de radical $\text{O}_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 em resposta a estímulos microbianos como *M. luteus*, zimosan e outros estímulos conhecidamente indutores do sistema imune em hemócitos de *R. microplus*. Por outro lado, não foi vista a produção de ERO em hemócitos de *R. microplus* na incubação com LPS (Pereira et al., 2001), sendo que este PAMP de bactérias Gram negativas está associado à indução na produção de ERO e ERN em

fagócitos (Hsu, Wen, 2002). Recentemente, foi demonstrado que *A. marginale* carece de genes que codificam componentes da via de síntese de LPS e PGN, evitando ser reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro, permitindo sua viabilidade intracelular. A perda desses genes pode ter sido um evento crítico durante a evolução dos antecessores da família Anaplasmataceae, sendo que alguns dos seus descendentes, tornaram-se bactérias intracelulares obrigatórias de células de defesa do hospedeiro (Lin, Rikihisa, 2003).

Conforme mencionada anteriormente, a CAT, a GPX e a PRX regulam a quantidade de H_2O_2 na célula. A atividade da CAT predomina unicamente em altas doses de H_2O_2 , em contraste com a atividade da GPX (Mishra, Imlay, 2013). A atividade da CAT foi igual nas células BME26 infectadas com *A. marginale* em relação ao controle, a exceção do aumento aproximado de 1,25 vezes na primeira hora de infecção (Figura 14). No entanto, o seu transcrito foi induzido nos experimentos utilizando como inóculo *A. marginale* em eritrócitos bovinos (Figura 7C), mas praticamente não modulado nos experimentos utilizando *A. marginale* em células de carrapato (Figura 9C). Da mesma forma, a atividade da GPX foi igual nas células BME26 infectadas (usando inóculo em células de carrapato) e o controle (Figura 15), apesar do aumento do transcrito *RmGPX* nos experimentos utilizando como inóculo *A. marginale* em eritrócitos bovinos (Figura 7C), mas uma diminuição do transcrito da *RmGPX* em 1 e 6 h após a infecção, em experimentos utilizando *A. marginale* em células de carrapato (Figura 9E e 9F). Mais experimentos focados na quantificação de ERO e ERN, assim como na dosagem das atividades das enzimas pró-oxidantes e antioxidantes são necessários para podermos entender melhor o papel do estresse oxidativo no controle de patógenos nos carrapatos.

Análises bioquímicas acerca do estresse oxidativo durante o desenvolvimento embrionário de *R. microplus* foram realizadas (Freitas et al., 2007). A atividade da CAT e o conteúdo de GSH nas fases embrionária e larval, tem uma correlação positiva com a atividade da GST. As atividades destas enzimas antioxidantes se mantêm altas por causa do estresse oxidativo no qual são submetidos os carrapatos nesses estádios. Verificou-se que a atividade da GST durante a fase embrionária tem um aumento crescente até o momento da eclosão. Após a eclosão, a atividade da GST decai abruptamente nos primeiros cinco dias e posteriormente, a atividade

aumenta significativamente. A diminuição do consumo do O₂ em conjunto com a alta atividade da GST em larvas, indica uma possível estratégia para sobreviver maior tempo no ambiente até a larva encontrar o hospedeiro (Freitas et al., 2007).

A resposta oxidativa é o principal mecanismo usado pelas células fagocíticas para combater patógenos invasores. Processos celulares, como a autofagia, dependem da produção de ERO através da atividade da NOX2 em neutrófilos infectados com *Salmonella typhimurium*. Foi demonstrado que as ERO geradas permitem o recrutamento da proteína de LC3 ao fagolisossomo, promovendo o processo de autofagia (Huang et al., 2009). Em células epiteliais do peixe-zebra (*Danio rerio*), o H₂O₂ produzido funciona como sinalizador, permitindo o recrutamento de neutrófilos para o sitio de infecção (Niethammer et al., 2009). Recentemente, foi demonstrada a participação das ERO (H₂O₂) na indução do fator de necrose tumoral (TNF), contribuindo no controle de *Mycobacterium tuberculosis*. O crescimento da bactéria é controlado em baixas quantidades de H₂O₂. Em contraste, na presença de grandes quantidades provoca necrose, resultando na liberação da bactéria e favorecendo a proliferação extracelular (Roca, Ramakrishnan, 2013).

Finalmente, os resultados aqui apresentados demonstraram que *A. marginale* promove uma modulação gênica diferencial e que os genes antioxidantes têm um papel fundamental na viabilidade das bactérias. Contudo, os ensaios bioquímicos realizados não nos permitiu evidenciar a produção de H₂O₂. Além disso, as atividades da CAT e GPX determinadas não correspondeu ao esperado, de acordo com os resultados prévios de expressão gênica. Uma explicação para esse resultado pode ser devido ao baixo número de *A. marginale* em células BME26, que pode não interferir nos ensaios mais sensíveis como é o caso do RT-qPCR. Considerando isto, nosso grupo de pesquisa pretende analisar a produção de H₂O₂, assim como as atividades enzimáticas envolvidas na produção e eliminação desta ERO, utilizando como desafio a *R. rickettsii* que consegue infectar até 100% das células BME26. Alternativamente, pode-se quantificar outras ERO e ERN, tais como O₂⁻, NO^{*}, ONOO⁻, investigar a peroxidação lipídica, determinar a quantidade de glutathiona oxidada/reduzida, que permitirão inferir sobre a proliferação de riquétsias nas células BME26.

6 CONCLUSÕES

O conjunto de dados aqui obtidos nos permitem concluir que existe uma modulação gênica diferencial do sistema pró-oxidante e antioxidante nas células BME26 frente a diferentes estímulos microbianos. Além disso, mostramos que *Anaplasma marginale* invade as células BME durante a primeira hora de exposição, evidenciando estruturas similares às relatadas em células provenientes de outras espécies de carrapatos.

A modulação gênica provocada por *A. marginale* sugere a formação de um ambiente antioxidante, provavelmente em decorrência à coevolução com seu vetor natural. A resposta provocada por *R. rickettsii*, estimulou um ambiente pró-oxidante e reduzindo a indução de genes antioxidantes. Adicionalmente, foi obtido um perfil similar no estímulo com os microrganismos inativados, considerando a diferença de componentes na parede celular de cada um possui.

A influência de alguns componentes do sistema antioxidante foi explorada nas células BME26 através da técnica de RNAi. Por esta metodologia, mostrou-se a importância que alguns destes componentes têm na viabilidade de *Anaplasma marginale*, sugerindo que a produção de espécies reativas de oxigênio esteja envolvida no controle deste patógeno. Apesar disso, não observou-se a produção de peróxido de hidrogênio nem o aumento de atividades enzimáticas antioxidantes utilizando abordagens bioquímicas. Os resultados obtidos pelos ensaios de silenciamento gênico abriram perspectivas para outros estudos acerca da resposta oxidativa das células BME26 frente a infecções. Além disso, pretende-se analisar a presença de outras moléculas como radical superóxido, óxido nítrico e peroxinitrito, assim como processos pró-oxidantes como peroxidação lipídica ou determinação do índice glutatona reduzida/glutatona oxidada, utilizando como desafio *Rickettsia rickettsii*, que consegue infectar 100% das células BME26.

Em suma, podemos concluir que as espécies reativas de oxigênio exercem influências importantes na viabilidade de *Anaplasma marginale*, podendo ter implicações essenciais na capacidade vetorial deste importante patógeno de países tropicais e subtropicais do mundo.

REFERÊNCIAS*

- Adler V, Yin Z, Fuchs S, Benezra M, Rosario L, Tew K, Pincus M, Sardana M, Henderson C, Wolf C, Davis R, Ronai Z. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO Journal*, 1999; 18(5): 1321–34.
- Agaisse H, Perrimon N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological Reviews*, 2004; 198: 72-82.
- Agüero-Rosenfeld M, Horowitz H, Wormser G, McKeena D, Nowakowski J, Muñoz J, Dumler J. Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. *Annals of Internal Medicine*, 1996; 125: 904-08.
- Antunes S, Galindo R, Almazán C, Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Shkap V, Rosário V, de la Fuente J, Domingos A. Functional genomics studies of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* ticks in response to infection with the cattle protozoan parasite, *Babesia bigemina*. *International Journal for Parasitology*, 2012; 42(2): 187–95.
- Ariki S, Takahara S, Shibata T, Fukuoka T, Ozaki A, Endo Y, Fujita T, Koshiba T, Kawabata S. Factor C acts as a lipopolysaccharide-responsive C3 convertase in horseshoe crab complement activation. *Journal of Immunology*, 2008; 181(11): 7994–01.
- Atkinson H, Babbitt P. Glutathione Transferases Are Structural and Functional Outliers in the Thioredoxin Fold. *Biochemistry*, 2009; 48(46): 11108–16.
- Bahia A, Oliveira J, Kubota M, Araújo H, Lima J, Ríos-Velásquez C, Pimenta, P. The Role of Reactive Oxygen Species in *Anopheles aquasalis* Response to *Plasmodium vivax* Infection. *PLoS ONE*, 2013; 8(2): 1–10.
- Banerjee R, Anguita J, Roos D, Fikrig E, Alerts E. Cutting Edge: Infection by the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis Prevents the Respiratory Burst by Down-Regulating gp91 phox. *Journal of Immunology*, 2000; 164(8): 3946-49.
- Bell-Sakyi L, Zweygarth E, Blouin E, Gould E, Jongejan F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends in Parasitology*, 2007; 23(9): 450-57.
- 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*, 2012; 37(1): 120–27.
- 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*, 2014; 9(5): 1–10.
- Blouin E, Saliki J, Kocan K, Rodgers S. Evaluation of *Anaplasma marginale* from Tick Cell Culture as an Immunogen for Cattle. *Annals New York Academy of Sciences*, 1998; 849(35): 253–58.
- Buchon N, Broderick N, Chakrabarti S, Lemaitre B. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes & Development*, 2009; 23: 2333-44.
- 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*, 2006; 93(2): 96–104.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Buresova V, Hajdusek O, Franta Z, Sojka D, Kopacek P. IrAM-An α_2 -macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus*: Characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen *Chryseobacterium indologenes*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009; 33(4): 489–498.
- Buresova V, Hajdusek O, Franta Z, Loosova G, Grunclova L, Levashina E, Kopacek P. Functional genomics of tick thioester-containing proteins reveal the ancient origin of the complement system *Journal of Innate Immunity*, 2011; 3(6): 623–30.
- Ceraul S, Sonenshine D, Hynes W. Resistance of the Tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) Following Challenge with the Bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *Journal of Medical Entomology*, 2002; 39(2): 376-83.
- Chapman A, Murphy S, Demma L, Holman R, Curns A, McQuiston J, Krebs J, Swerdlow L. Rocky Mountain spotted fever in the United States, 1997-2002. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 2006. 6(2): 170-8.
- Chávez A, Felsheim R, Kurtii T, Ku P, Brayton K, Munderloh U. Expression Patterns of *Anaplasma marginale* msp2 Variants Change in Response to Growth in Cattle, and Tick Cells versus Mammalian Cells. *PLoS ONE*, 2012; 7(4): 1-13.
- Choi K, Park J, Dumler J. *Anaplasma phagocytophilum* Delay of Neutrophil Apoptosis through the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Pathway. *Infection and Immunity*, 2005; 73(12); 8209-18.
- Cirimotich C, Dong Y, Clayton A, Sandiford S, Souza-Neto J, Mulenga M, Dimopoulos G. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science*, 2011; 332(6031): 55–858.
- Citelli M, Lara F, Vaz I, Oliveira P. Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2007; 151(1): 81–88.
- Cossío-Bayúgar R, Miranda E, Holman P. Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005; 35(12): 1378–87.
- Cruz C, Fogaça A, Nakayasu E, Angeli C, Belmonte R, Almeida I, Daffre, S. Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. *Parasites & Vectors*, 2010; 3(63): 1-15.
- Dantas-Torres F. Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infectious Disease*, 2007; 7(11): 724-32.
- Das S, Banerjee G, DePonte K, Marcantonio N, Kantor F, Fikrig E. Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *The Journal of Infectious Diseases*, 2001; 184(8), 1056–64.
- 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*, 2004; 1026(1): 257–66.
- De la Fuente J, Blouin E, Manzano-Roman R, Naranjo V, Almazán C, Pérez de la Lastra J, Kocan, K. Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. *Genomics*, 2007; 90(6): 712–22.
- De La Fuente J, Ruybal P, Mtshali M, Naranjo V, Shuqing L, Mangold A, Rodríguez S, Jimenez R, Vicente J, Moretta R, Torina A, Almazán C, Mbatia P, Torioni S, Farber M, Rosario-Cruz R, Gortazar C, Kocan K. Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. *Genomics*, 2007; 90(6): 712–22.
- De La Fuente J, Kocan M, Almazan C. Targeting the tick-pathogen interface for novel

control strategies. *Frontiers in Bioscience*, 2008; 13(5): 6947-56.

- De Silva A, Telford S, Brunet L, Barthold S, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission blocking Lyme disease vaccine. *Journal of Experimental Medicine*, 1996; 183(1): 271–75.

- Edens W, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade J, Lee T, Lambeth J. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *Journal of Cell Biology*, 2001; 154(4): 879–91.

- Eggenberger L, Lamoreaux W, Coons L. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. *Experimental Parasitology*, 1990; (9), 279–87.

- Elliott N, Volkert M. Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans. *Molecular and Cellular Biology*, 2004; 24(8): 3180–87.

- Esteves E, Lara F, Lorenzini D, Costa G, Fukuzawa A, Pressinotti L, Daffre S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008; 38(5), 568–80.

- Esteves E, Bastos C, Zivkovic Z, De La Fuente J, Kocan K, Blouin E, 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*, 2009; 161(1-2): 150–53.

- Esteves E, Pohl P, Klafke G, Reck J, Fogaça A, Martins J, Daffre S. Low temperature affects cattle tick reproduction but does not lead to transovarial transmission of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 2015; 214(3-4): 322–26.

- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas J, Guglielmone A, Horak I, Jongejan F, Walker A. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Applied Acarology*, 2006; 38(1), 219–35.

- Felsheim R, Oliva A, Palmer G, Crosby L, Barbet A, Kurtti T, Munderloh U. Transformation of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 2010; 167(1): 167-74.

- Fogaça A, Lorenzini D, Kakua L, Esteves E, Bulet P, Daffre S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004; 28(1): 191–200.

- Fogaça A, 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*, 2006; 27(4): 667–74.

- Francischetti I, Nunes A, Mans B, Santos I, Ribeiro M. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers Bioscience*, 2010; 18(9): 2051–88.

- Freitas D, Rosa R, Moraes J, Campos E, Logullo C, Da Silva Vaz I, Masuda A. Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007; 146(4): 688–94.

- French D, McElwain T, Mcguire T, Palmer G, Palmer, G. Expression of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Variants during Persistent Cyclic Rickettsemia Expression of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Variants during Persistent Cyclic Rickettsemia, 1998; 66(3): 1200-07.

- Galletti M, Fujita A, Nishiyama M, Malossi C, Pinter A, Soares J, Daffre S, Labruna M, Fogaça A. Natural Blood Feeding and Temperature Shift Modulate the Global Transcriptional

Profile of *Rickettsia rickettsii* Infecting Its Tick Vector. *PLoS One*, 2013. 8(10): 1-12.

- Ge Y, Yoshiie K, Kuribayashi F, Lin M, Rikihisa Y. Anaplasma phagocytophilum inhibits human neutrophil apoptosis via upregulation of bfl-1, maintenance of mitochondrial membrane potential and prevention of caspase 3 activation. *Cellular Microbiology*, 2005; 7(1): 29–38.

- Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci P. Hydrogen peroxide: a metabolic by product or a common mediator of ageing signals? *Nature Reviews*, 2007; 8: 722-28.

- Gonçalves R, Oliveira J, Oliveira G, Andersen J, Oliveira M, Oliveira P, Barillas-Mury C. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Modulate Mosquito Susceptibility to Plasmodium Infection. *PLoS ONE*, 2012; 7(7): 1-10.

- Graça-Souza A, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva G, Braz G, Paes M, Sorgine M, Oliveira P. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2006; (36): 322-35.

- 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*, 2014; 23(2): 150–56.

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

- Grubhoffer L, Rego R, Hajdušek O, Hypša V, Kovář V, Rudenko N, Oliver J. Tick lectins and fibrinogen-related proteins. In: Grubhoffer, L. *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge: Cambridge University Press; 2008. 127–142.

- Grunclová L, Fouquier H, Hypša V, Kopáček P. Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: The sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Developmental and Comparative Immunology*, 2003; 27(8): 651–60.

- Guglielmone A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in Sotun and Central America. *Veterinary Parasitology*, 1995; 57(1-3), 109–19.

- Ha E, Oh C, Bae Y, Lee W. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science*, 2005; 310(5749): 847–50.

- Ha E, Lee K, Seo Y, Kim S, Lim J, Oh B, Lee W. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in *drosophila* gut. *Nature Immunology*, 2009; 10(9): 949–57.

- Hajdušek O, Síma R, Ayllón N, Jalovecká M, Perner J, de la Fuente J, Kopáček P. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2013; 3(6): 1-15.

- Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology*. Oxford: Oxford University Press. 2003: p777

- He H, Chen A, Davey R, Ivie G, George J. Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999; 29(8): 737–43.

- Homer M, Aguilar-delfin I, Iii S, Krause P, Persing D, Ev C. Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000; 13(3): 451–69.

- Hong J, Santucci L, Tian X, Silverman D. Superoxide Dismutase-Dependent, Catalase-Sensitive Peroxides in Human Endothelial Cells Infected by *Rickettsia rickettsii*. *Infection and Immunity*, 1998; 66(4): 1293–98.

- Hsu H, Wen M. Lipopolysaccharide-mediated Reactive Oxygen Species and Signal Transduction in the Regulation of Interleukin-1 Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277(5): 22131-39.
- Huang J, Canadien V, Lam G, Steinberg B, Dinauer M, Magalhaes M, Brumell J. Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009; 106(15): 6226–31.
- Imlay J. In: *EcoSal--Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press; Washington, D.C.: 2009. <http://www.ecosal.org>. [acesso (2016 04 16)]
- 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*, 2010; 5(6): 1–9.
- Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti G, Eaton J, Balla G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*, 2002; 100(3): 879–87.
- Jongejans F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*, 2004; 129(5): 3–14.
- Kanaoka Y, Ago H, Inagaki E, Nanayama T, Miyano M, Kikuno R, Fujii Y, Eguchi N, Toh H, Urade Y, Hayaishi O. Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell*, 1997; 90(6): 1085–95.
- Kleino A, Silverman N. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014; 42(1): 25-35.
- Kocan K, De La Fuente J, Alberto A, Meléndez R. Antigenes and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Antigenes and Alternatives for Control of Anaplasma marginale Infection in Cattle*, 2003; 16(4): 698-712.
- Kocan K, De la Fuente J, Blouin E, Coetzee J, Ewing S. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 2010; 167(2-4): 95–107.
- Kopáček P, Hajdusek O, Buresová V, Daffre S. Tick Innate Immunity. In K. Soderhall Ed., *Invertebrate Immunity*. 2010: p1–26.
- Kumar S, Molina-Cruz A, Gupta L, Rodrigues J, Barillas-Mury C. A Peroxidase/Dual Oxidase System Modulates Midgut Epithelial Immunity in *Anopheles gambiae*. *Science*, 2010; 327(5973): 1644–48.
- Kuttler K. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. *Journal of Wildlife Diseases*, 1984; 20(1): 12–20.
- Lai R, Takeuchi H, Lomas L, Jonczyk 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 : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2004; 18(1): 1447–49.
- Lambeth J. NOX enzyme and the biology of the reactive oxygen. *Nature Reviews. Immunology*, 2004; (4), 181–89.
- Lemaitre, B. The road to Toll. *Nature reviews. Immunology*, 2004; 4: 521-27.
- Lin M, Rikihisa Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for a lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infection and Immunity*, 2003; 71: 5324-31.
- Lin M, Rikihisa Y. Degradation of p22phox and inhibition of superoxide generation by *Ehrlichia chaffeensis* in human monocytes. *Cellular Microbiology*, 2007; 9(4): 861–74.
- Liochev S, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox*

Report : Communications in Free Radical Research, 2002; 7(1), 55–57.

- Liu L, Narasimhan S, Dai J, Zhang L, Cheng G, Fikrig E. Ixodes scapularis salivary gland protein P11 facilitates migration of Anaplasma phagocytophilum from the tick gut to salivary glands. EMBO Reports, 2011; 12(11), 1196–03.

- Liu Z, Liu H, Liu X, Wu X. Purification and cloning of a novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, Ixodes sinensis. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 2008; 149(4): 557–61.

- Liu L, Dai J, Zhao Y, 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. Journal of Infectious Diseases, 2012; 206(8): 1233–41.

- Liu K, Edwards B, Lee S, Finelli M, Davies B, Davies K, Oliver P. Neuron-specific antioxidant OXR1 extends survival of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Brain, 2015; 138(1): 1167–81.

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

- Loosova G, Jindrak L, Kopacek P. Mortality caused by experimental infection with the yeast Candida haemulonii in adults of Ornithodoros moubata (Acarina: Argasidae). Folia Parasitology (Praha), 2001; 48(1): 149–53.

- Low F, Hampton M, Winterbourn C. Peroxiredoxin 2 and Peroxide Metabolism in the Erythrocyte. Antioxidants and Redox Signaling. 2008;10(9): 1621-30.

- Lu X, Che Q, Lv Y, Wang M, Lu Z, Feng F, Yu H. A novel defensin-like peptide from salivary glands of the hard tick, Haemaphysalis longicornis. Protein Science, 2010; 19(1), 392–397.

- Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara L, Ranson H. The role of the Aedes aegypti Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2011; 41(3): 203–09.

- Ma B, Simala-Grant J, Taylor D. Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. Glycobiology, 2006; 16(12): 158–84.

- Maeda K, Markowitz N, Hawley R, Ristic M, Cox D, McDade J. Human Infection with Ehrlichia canis, a Leukocytic Rickettsia. The New England Journal of Medicine, 1987; (316), 853–56.

- Mathers J, Flick S, Cox Jr. Longer-duration uses of tetracyclines and penicillins in U.S. food-producing animals: Indications and microbiologic effects. Environment International, 2011; 37(5): 991-04.

- Mishra S, Imlay J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?. Archives Biochemistry Biophysics, 2013; 18(9): 1199–1216.

- Molina-Cruz A, DeJong R, Charles B, Gupta L, Kumar S, Jaramillo-Gutierrez G, Barillas-Mury C. Reactive oxygen species modulate Anopheles gambiae immunity against bacteria and Plasmodium. The Journal of Biological Chemistry, 2008; 283(6): 3217–23.

- Mott J, Rikihisa Y, Tsunawaki S, Mmun I. Effects of Anaplasma phagocytophila on NADPH Oxidase Components in Human Neutrophils and HL-60 Cells, 2002; 70(3): 1359–66.

- Muller U. The nitric oxide system in insects. Progress in Neurobiology, 1997; 51(3):363-81.

- Munderloh U, Blouin E, Kocan K, Ge N, Edwards W, Kurtti T. Establishment of the Tick (Acari: Ixodidae)-Borne Cattle Pathogen Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Tick Cell Culture. Journal of Medical Entomology, 1996; 33(4):656-65.

- Munderloh U, Jauron S, Fingerle V, Leitritz L, Hayes S, Hautman J, Goodman J. Invasion and Intracellular Development of the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent in Tick Cell Culture Invasion and Intracellular Development of the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent in Tick Cell Culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999; 37(8): 2518–24.
- Nappi A, Vass E, Frey F, Carton Y. Nitric Oxide Involvement in *Drosophila* Immunity. *Nitric Oxide*, 2000; 4(4): 423-30.
- Narasimhan S, Fikrig E. Tick microbiome, the force within. *Trends in Parasitology*, 2015; 31(7): 315-23.
- Nava S, Guglielmone A, Mangold A. An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience*, 2009; 14(14): 2857–77.
- Niethammer P, Grabher C, Thomas L, Mitchison T. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*, 2009; 459(7249): 996–99.
- Niu H, Rikihisa Y, Yamaguchi M, Ohashi N. Differential expression of VirB9 and VirB6 during the life cycle of *Anaplasma phagocytophilum* in human leucocytes is associated with differential binding and avoidance of lysosome pathway. *Cellular Microbiology*, 2006; 8(3), 523–34.
- Noh S, Ueti M, Palmer G, Munderloh U, Felsheim R, Brayton K. Stability and Tick Transmission Phenotype of gfp-Transformed *Anaplasma marginale* through a Complete In Vivo Infection Cycle. *Applied And Environmental Microbiology*, 2011; 77(1): 330-34.
- Nuss M, Nuss A, Meyer J, et al. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nature Communications*, 2016; 7(10507): 1-13.
- Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, 2011; 43(2): 138–51.
- Oliveira J, Gonçalves R, Lara F, Dias F, Gandara A, Menna-Barreto R, Oliveira P. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLoS Pathogens*, 2011; 7(3): 1-14.
- Oliver P, Finelli M, Edwards B, Bitoun E, Butts D, Becker E, Davies K. Oxr1 is essential for protection against oxidative stress-induced neurodegeneration. *PLoS Genetics*, 2011; 7(10), 1-15.
- Paes M, Oliveira M, Oliveira P. Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2001; 48(2): 63–71.
- Pal U, Li X, Wang T, Montgomery R, Ramamoorthi N, DeSilva A, Fikrig E. TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell*, 2004; 119(4): 457–68.
- Palmer G, Oberle S, Barbet A, Goff W, Davis W, McGuire T. Immunization of cattle with a 36-kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. *Infection and Immunity*, 1988; 56:1526-31.
- Palmer G, McElwain T. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 1995; 57:233-53.
- Pedra J, Narashimhan S, Rendić D, DePonte K, Bell-Sakyi L, Wilson I, Fikrig E. Fucosylation enhances colonization of ticks by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cellular Microbiology*, 2010; 12(9):1222-34.
- Pereira L, Oliveira P, Barja-Fidalgo C, Daffre S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental Parasitology*, 2001; 99(2): 66–72.

- 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*, 2009; 390(3): 511–5.
- 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*, 2006; 1078(1): 523–29.
- Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002; 33(11):1451-64.
- Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004; 101(12), 4003–8.
- Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova M, Feyereisen R. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 2002; 298(5591): 179–81.
- Reeves E, Lu H, Jacobs H, Messina C, Bolsover S, Gabella G, Segal A. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*, 2002; 416(6878): 291–97.
- Rego R, Hajdusek O, Kovár V, Kopáček P, Grubhoffer L, Hypsa 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*, 2005; 35(9): 991–1004.
- 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*, 2006; 36(4): 291–9.
- Reynolds E. The use of lead citrate stain at high pH in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 1963; 17(1), 208-12.
- Ribeiro M, Filho E, Passos L, Saturnino H, Malacco M. Use of standardized inoculum of *Anaplasma marginale* and chemoprophylaxis to control bovine anaplasmosis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2003; 55(1): 21-26.
- Richey E. Bovine anaplasmosis. In: Richey E, *Current Veterinary Therapy Food Animal Practice*. Philadelphia: W. B. Saunders. 1981: 767–772.
- Rydkina E, Sahni A, Silverman D, Sahni S. *Rickettsia rickettsii* Infection of Cultured Human Endothelial Cells Induces Heme Oxygenase 1 Expression. *Infection and Immunity*, 2002; 70(8): 4045-52.
- Roca F, Ramakrishnan L. TNF Dually Mediates Resistance and Susceptibility to Mycobacteria Through Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Cell*, 2013; 153(3): 521–34.
- Rodríguez-Ramos T, Carpio Y, Bolívar J, Espinosa G, Hernández-López J, Gollas-Galván T, Ramos L, Pendón C, Estrada M. An inducible nitric oxide synthase (NOS) is expressed in hemocytes of the spiny lobster *Panulirus argus*: cloning, characterization and expression analysis. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010; 29(3):469-79.
- Rosa R, Capelli-Peixoto J, Mesquita R, Kalil S, Pohl P, Braz G, Fogaça A, 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*, 2016; 59: 1-14.
- Sacco A, Kessler R, Madruga C. Cepas atenuadas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e de *Anaplasma centrale* como imunógenos no controle da tristeza parasitária bovina. *Ciência Rural*, 2001; 31(5): 849-55.

- Sawicki R, Singh S, Mondal A, Benes H, Zimniak P. Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class. *The Biochemical Journal*, 2003; 370(2): 661–9.
- Seaver L, Imlay J. Hydrogen Peroxide Fluxes and Compartmentalization inside Growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2001; 183(24): 7182-89.
- Sheehan D, Meade G, Foley V, Dowd C. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 2001; 360(1): 1–16.
- Schuijt T, Hovius J, Van Burguel N, Ramamoorthi N, Fikrig E, Van Dam A. The Tick Salivary Protein Salp15 Inhibits the Killing of Serum-Sensitive *Borrelia burgdorferi* Senu Lato Isolates. *Infection and Immunity*, 2008; 76(7): 2888-94.
- Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 1999; 27(99): 916–21.
- 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*, 2009; 284(50): 34735–46.
- Silverman D, Santucci L. Potential for free radical-induced lipid peroxidation as a cause of endothelial cell injury in Rocky Mountain spotted fever. *Infection and Immunity*, 1988; 56(12): 3110–5.
- Smith A, Pal U. Immunity-related genes in *Ixodes scapularis*--perspectives from genome information. *Frontiers in cellular and infection microbiology*; 2014; 4(116): 1-12.
- Sonenshine D, Roe M. In: Sonenshine D, Overview: Ticks, People, and Animals, in: *Biology of Ticks*, New York: Oxford University Press; 2014. 3-16.
- Spurgeon S, Jones R, Ramakrishnan R. High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS ONE*, 2008; 3(1): 1-14.
- Stanek G, Wormser G, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *The Lancet*, 2011; 379(9814): 461–73.
- Steere A, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *Journal of Clinical Investigation*, 2004; 113(8): 1093–01.
- Sterba J, Dupejova J, Fiser M, Vancova M, Grubhoffer L. Fibrinogen-related proteins in ixodid ticks. *Parasites & Vectors*, 2011; 4(127): 1-10.
- 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*, 2007; 16, 2160-63.
- 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*, 2006; 203(6): 1507–17.
- Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS Journal*, 2008; 275(13): 3249–77.
- Tsuji N, Fujisaki K. Longicin plays a crucial role in inhibiting the transmission of *Babesia* parasites in the vector tick *Haemaphysalis longicornis*. *Future Microbiology*, 2007; 2(6): 575–8.

- Tsuji N, Miyoshi T, Battsetseg B, Matsuo T, Xuan X, Fujisaki K. A Cysteine Protease Is Critical for *Babesia* spp. Transmission in *Haemaphysalis* Ticks. *PLoS Pathogens*, 2008; 4(5): 1-14.
- Ullmann A, Lima C, Guerrero F, Piesman J, Black W. Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Molecular Biology*, 2005; 14(1): 217–22.
- Volkert M, Elliott N, Housman D. Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes. *PNAS*, 2000; 97(1): 14530–35.
- Voth D, Broederdorf L, Graham J. Bacterial Type IV Secretion Systems: Versatile Virulence Machines. *Future Microbiology*, 2012; 7(2): 241-57.
- Wang D, Li F, Chi Y, Xiang J. Potential relationship among three antioxidant enzymes in eliminating hydrogen peroxide in penaeid shrimp. *Cell Stress & Chaperones*, 2012; 17(4): 423–33.
- Wang K, Zhang T, Dong Q, Nice E, Huang C, Wei Y. Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Death & Disease*, 2013; 4(3): 1-10.
- Xi Z, Ramirez J, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathogen*, 2008; 4(7): 1-12.
- Yang X, Smith A, Williams M, Pal U. A dityrosine network mediated by dual oxidase and peroxidase influences the persistence of lyme disease pathogens within the vector. *Journal of Biological Chemistry*, 2014; 289(18): 12813–22.
- Yang M, Luna L, Sørnbø J, Alseth I, Johansen R, Backe P, Bjørås M. Human OXR1 maintains mitochondrial DNA integrity and counteracts hydrogen peroxide-induced oxidative stress by regulating antioxidant pathways involving p21. *Free Radical Biology & Medicine*, 2014; 77(C): 41–48.
- Zhang L, Zhang Y, Adusumilli S, Liu L, Narasimhan S, Dai J, Fikrig E. Molecular Interactions that Enable Movement of the Lyme Disease Agent from the Tick Gut into the Hemolymph. *PLoS Pathogens*, 2011; 7(6): 1-12.
- Zhou J, Ueda M, Umemiya R, Battsetseg B, Boldbaatar D, Xuan X, Fujisaki K. A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2006; 36(7): 527–35.