ELIANE VIRGINIA DA SILVA ESTEVES

Células embrionárias BME26: modelo para o estudo da interação *Anaplasma marginale* e o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

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

SÃO PAULO

2009

ELIANE VIRGINIA DA SILVA ESTEVES

**Células embrionárias BME26: modelo para o estudo
da interação *Anaplasma marginale* e o carrapato
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

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

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sirlei Daffre

SÃO PAULO

2009

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

© reprodução total

Esteves, Eliane Virginia da Silva.

Células embrionárias BME26: modelo para o estudo da interação *Anaplasma marginale* e o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* / Eliane Virginia da Silva Esteves. -- São Paulo, 2009.

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: Bioquímica e Imunologia de Artrópodes.

Versão do título para o inglês: Embryonic cell line BME26 a model for the study of the interaction between *Anaplasma marginale* and the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Descritores: 1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 2. Cultura de células 3. Sistema imune 4. Peptídeos antimicrobianos 5. *Anaplasma marginale* 6. RNA de interferência 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/SBIB0233/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Eliane Virginia da Silva Esteves.

Título da Tese: Células embrionárias BME26: modelo para o estudo da interação *Anaplasma marginale* e o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

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 "Jardim do Salto" - São Carlos
Av. Prof. Lineu Prestes, 349 - CEP. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (051) (011) 5091.7733 - telex: (051) (011) 5091.7433
e-mail: icb@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 95 nas fls. 61 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Sirlei Daffre, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Avaliação da importância da microplasma e da defensina na resposta imunológica do carrapato *Boophilus microplus*"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Eliane Virginia Esteves da Silva** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em 15.10.08, com validade de 3 anos.

São Paulo, 15 de outubro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

Dedico este trabalho ao meu marido, Marcelo, que merece mais do que todos a minha volta um ato de reconhecimento, embora que pequeno, pela sua dedicação, compreensão e paciência, suportando minha ausência, muitas vezes literal, durante todo o tempo do meu Doutorado, porém nunca desistiu de me apoiar e estimular, e acima de tudo de me amar!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, supremo Criador e Mantenedor do Universo, por sustentar-me diariamente em sua infinita misericórdia.

À Prof^a. Dra **Sirlei Daffre**, pelo imenso carinho e dedicação, ao longo de todos esses anos, me orientando incansavelmente, me mostrando o caminho e me fazendo acreditar que tudo é possível, MUITO OBRIGADA.

Aos meus filhos **Flávia e Luiz Victor**, que são as bênçãos que recebi das mãos de Deus, agradeço pelo companheirismo em todos os momentos, que me fizeram chegar até aqui.

Aos meus **Pais**, agradeço por me colocarem no caminho da retidão e do caráter e por me estimularem também a trilhar o caminho do saber.

Agradeço ao meu **Tio Mauricio** e minha **Tia Marina**, que são meu porto seguro em todos os momentos, e sempre estiveram sempre ao meu lado durante minhas conquistas.

A minha ajudante incansável **Darci**, que com carinho atenção cuidou da minha casa, durante os últimos 5 anos.

Agradeço imensamente ao **Oswaldo e Eva**, jamais esquecerei a boa vontade e o carinho que dedicaram a mim no início da minha vida acadêmica.

Às minhas amigas gordinhas: **Aline, Déa e Fê**, sem vocês eu não teria tido coragem de ir tão longe e não teria enfrentado tantos desafios. Obrigada pela ajuda sempre presente e o estímulo para prosseguir, mas acima de tudo OBRIGADA pela amizade e pelo carinho que vocês dedicaram a mim. Além de tudo, **Déa**, muito obrigada pela atenciosa leitura desse texto!

Serei sempre grata aos meus amigos **Abrahim e Cristina**, que embora agora distantes me ajudaram muito no início dessa longa jornada.

Aos amigos do laboratório **Carlos** (pelo seu apoio na confecção do abstract), **Rodrigo, Rafael, Pedro, Claudia, Thais, Maria Fernanda, Diego, Camila, Paula** agradeço a amizade e companheirismo na rotina diária do trabalho e os momentos felizes de descontração e brincadeira.

Ao meu querido amigo, **Lourival** que está longe dos olhos, mas bem perto sempre, do meu coração.

À **Susana**, que me estimula diariamente, me auxilia e que “ganha pouco mas se diverte”, sua alegria é contagiante.

Ao Dr. **Timoty Kurtti**, por ceder ao nosso laboratório a cultura de células BME26, que foi toda a base desse trabalho.

Ao Prof.^o Dr. **Jose de La Fuente** (PP), que me recebeu em seu laboratório, com grande atenção e carinho e me fez sentir por um curto período de tempo parte de sua equipe.

Aos meus queridos amigos **Mário y Bianky**, suas filhas Gabi y Elena, jamais esquecerei o carinho e dedicação com que me receberam em Ciudad Real, e fizeram com que eu me sentisse como parte de sua família.

À querida **Zorica**, que pacientemente me auxiliou na confecção das bibliotecas subtrativas e me brindou com sua amizade, além disso, me ensinou a falar *español*.

Aos amigos do Laboratório de Genômica do IREC, **Vitória Naranjo, Maria Esther, Ruth Galindo**, que me receberam com atenção e me suportaram a minha estadia em seu laboratório.

À **Camila Bastos**, pela amizade e carinho que me fez companhia em um momento difícil, e me estimulou a viver grandes aventuras e ainda me ensinou que “mineiro nunca perde o trem”.

Ao Prof.^o Dr. **Múcio Ribeiro** e a Prof.^a Dra **Lygia Passos**, por cederem a cepa de *Anaplasma marginale* e também a atenciosa **Mercês** que me mostrou todos os “truques” para o cultivo das bactérias.

Ao Prof. Dr. **Jesus Ferro** e ao **Gustavo**, pelo seqüenciamento dos clones da biblioteca de cDNA.

Ao Dr. **Daniel Macedo Lorenzini**, pela análise da sequência e confecção do banco. Valeu Dani!

Ao Dr. **Flávio Lara**, que ajudou imensamente nas microscopias e até me deixou ficar na sua casa, nas idas ao Rio de Janeiro.

Ao Prof. Dr **José Roberto**, e todos os seus alunos **Bruno, Leandro** que foram pessoas essenciais na caracterização das células.

Aos técnicos da microscopia, **Edson, Gaspar, Gerson** (in memoriam).

Ao **Manoel**, técnico que me auxiliou com as imunizações para produção do anti-soro, mas além de tudo sempre é atencioso e carinhoso comigo, me estimulando e ouvindo minhas lamentações.

Ao **Cassiano** por confeccionar as figuras para publicação dos trabalhos, sempre com atenção e paciência, diante de tantas solicitações.

A todos os Professores, técnicos e amigos do Departamento de Parasitologia, que sempre me receberam com muita atenção em seus laboratórios e sempre me atenderam em todas as minhas solicitações.

Às funcionárias da Secretaria do Departamento de Parasitologia e da Pós-Graduação, pela atenção e gentileza em todos os momentos.

Aos ***amigos e colegas*** de trabalho do ***UNASP***.

À ***FAPESP***, pelo auxílio financeiro

“O mundo tem seus grandes ensinadores, homens de poderoso intelecto e vasta capacidade de pesquisa, pessoa cujas palavras têm estimulado o pensamento e revelado extensos campos ao saber; tais indivíduos têm sido honrados como guias e benfeitores do gênero humano; há, porém, Alguém que se acha acima deles.”

Ellen White

RESUMO

ESTEVES, E. **Células embrionárias BME26: modelo para o estudo da interação *Anaplasma marginale* e o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o principal vetor da riquetsia *Anaplasma marginale*, o agente etiológico da anaplasmosse, uma doença que acomete os rebanhos e causa sérios prejuízos econômicos à pecuária no Brasil. Pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na relação do carrapato *R. (B.) microplus* e os patógenos por ele transmitidos. Uma das maiores dificuldades encontradas em desenvolver esses estudos deve-se a preferência do carrapato pela alimentação no bovino, sendo necessário, para isso, manter um biotério de bovinos. Dentro desse contexto, o foco do presente trabalho foi estabelecer um sistema de infecção *in vitro* para explorar a interface entre o carrapato *R. (B.) microplus* e a riquetsia *A. marginale*. Para isso, foi implantado em nosso laboratório o cultivo da linhagem de células BME26 que são originárias do *R. (B.) microplus*. As células BME26 desempenham funções imunológicas, tais como, fagocitose e expressão dos genes dos peptídeos antimicrobianos (AMPs): microplusina, defensina e ixodidina. A infecção por *A. marginale*, um patógeno que é naturalmente transmitido pelo carrapato *R. (B.) microplus*, foi estabelecida nas células BME26. Muito embora alguns trabalhos da literatura tenham mostrado o estabelecimento de sistemas *in vitro* para o cultivo de *A. marginale*, não havia sido mostrado ainda o cultivo dessa riquetsia em células do seu vetor natural. Detectamos que a expressão gênica da defensina e da ixodidina nas células BME26 é aumentada frente à infecção por *A. marginale*. Por outro lado, nenhuma alteração da expressão gênica da microplusina foi constatada nesse desafio. Interessantemente, quando as células foram expostas a microorganismos inativados por calor e LPS, verificamos que a expressão gênica da microplusina é aumentada frente a todos os estímulos. Na exposição das células BME26 com a bactéria *Micrococcus luteus*, a expressão gênica da defensina e da ixodidina não foi alterada. Além disso, no estímulo das BME26 com leveduras, verificamos que a expressão gênica da ixodidina foi significativamente reprimida. Conjuntamente, os dados do perfil de expressão gênica dos AMPs frente aos

diversos desafios sugerem a presença de diferentes vias regulatórias, tal como já foi descrito para a mosca de frutas *Drosophila melanogaster* (HOFFMANN e REICHHART, 2002). Os genes da microplusina e da defensina foram silenciados nas células BME26 infectadas com *A. marginale* por RNA de interferência (RNAi), mas não verificamos no número de riquetsias. Esse resultado pode ser atribuído ao fato das análises terem sido realizadas em curto período de tempo (72 h), não permitindo analisar os efeitos que o silenciamento gênico dos AMPs poderia causar sobre as riquetsias liberadas para o meio extracelular. Em conjunto, nossos resultados evidenciam o potencial do uso das células BME26 para o estudo da interação de *R. (B.) microplus* com *A. marginale*, além de outros patógenos.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Cultura de células. Sistema imune. Peptídeos antimicrobianos. *Anaplasma marginale*. RNA de interferência. Transcrição gênica.

ABSTRACT

ESTEVEES, E. **Embryonic cell line BME26: a model for the study of the interaction between *Anaplasma marginale* and the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Ph. D. Thesis – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is the main vector of the rickettsia *Anaplasma marginale*, the etiological agent of anaplasmosis, a disease that affects cattle and causes serious economic losses to the Brazilian cattle industry. Little is known about the mechanisms involved in the interactions between the tick *R. (B.) microplus* and the pathogens it transmits. One of the greatest difficulties encountered in developing these studies comes from the preference of ticks for feeding on their natural host, making it necessary to maintain an animal facility. In view of that, this work focuses on the establishment of an *in vitro* infection system aimed at exploring the interaction between the tick vector and *Anaplasma marginale*. To accomplish that, we developed a cell culture in our laboratory using the embryonic cell line BME26 from *R. (B.) microplus*. These cells present immune properties, such as phagocytosis and expression of genes encoding the antimicrobial peptides microplusin, defensin and ixodidin. An experimental infection by *A. marginale*, a pathogen naturally transmitted by *R. (B.) microplus*, was established in these cells. Although some reports have shown *A. marginale* infection in culture, this pathogen had not been previously cultured in cells from its own natural vector. We verified that defensin and ixodidin gene expression increased in these cells after an infection by *A. marginale*. On the other hand, no alteration in microplusin gene expression was detected after this challenge. Interestingly, when BME26 cells were exposed to heat-inactivated microorganisms or to LPS, microplusin gene expression increased after all stimuli. After exposure of BME26 cells to *Micrococcus luteus*, expression levels of defensin and ixodidin did not change. Additionally, ixodidin gene expression reduced significantly after exposure of these cells to yeast. Collectively, the expression profile of the AMP genes obtained with different stimuli suggests the presence of different regulatory pathways, as previously described in the fruitfly *Drosophila melanogaster* (ref). Also, microplusin and defensin genes were silenced by RNA interference

(RNAi) in *A. marginale*-infected BME26 cells, but we did not observe alteration in the number of MSP4 rickettsias, probably because analyses were carried out in a short period of time (72h), precluding the analysis of the effect of gene silencing of AMPs on the rickettsiae released to the extracellular media. Taken together, our results show the potential of BME26 cells to be used as a tool to understand their interaction with *A. marginale* and with other pathogens.

Key words: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Cell culture. Immune system. Antimicrobial peptides. *Anaplasma marginale*. RNA interference. Gene transcription.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos do fragmento da subunidade 16S do rRNA mitocondrial	49
Figura 2 - Caracterização morfológica das células BME26	51
Figura 3 - Caracterização do conteúdo das vesículas das células BME26	52
Figura 4 - Caracterização das células BME26 por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	53
Figura 5 - Endocitose da hemoglobina pelas células BME26	54
Figura 6 - Imunolocalização da microplusina nas células BME26	55
Figura 7 - Fagocitose das células BME26 incubadas com <i>S. cerevisiae</i>	56
Figura 8 - Perfil de expressão gênica das células BME26	57
Figura 9 - Células BME26 infectadas com <i>Anaplasma marginale</i> (UFMG1)	60
Figura 10 - Perfil de expressão gênica dos AMPs em células BME26 infectadas com <i>Anaplasma marginale</i>	61
Figura 11 - Perfil de expressão gênica dos AMPs em células BME26 estimuladas com bactérias <i>Enterobacter cloacae</i> inativadas por calor	62
Figura 12 - Perfil de expressão gênica dos AMPs em células BME26 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS)	63
Figura 13 - Perfil de expressão gênica dos AMPs em células BME26 estimuladas com bactérias <i>Micrococcus luteus</i> inativadas por calor	64
Figura 14 - Perfil de expressão gênica dos AMPs, em células BME26 estimuladas com bactérias <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inativadas por calor ...	64
Figura 15 - Sequências deduzidas de aminoácidos dos contíguos 66 e 73 identificados na biblioteca de genes diferencialmente expressos nas células BME26 infectadas com <i>Anaplasma marginale</i>	68
Figura 16 - Perfil de expressão gênica do capsídeo viral presente em células BME26 infectadas com <i>Anaplasma marginale</i>	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para as PCR e qPCR.	34
Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a síntese de dsRNA, acrescidos da sequência promotora T7 (destacada em vermelho)	35
Tabela 3 - Comparação da sequência do fragmento da subunidade 16S do rRNA mitocondrial da cultura de células BME26 com as sequências de outras espécies de carrapatos pertencentes à família Ixodidae.....	50
Tabela 4 - Transcritos relacionados com sistema imune identificados na biblioteca de cDNA da células BME26	58
Tabela 5 - Tratamento das células BME26 com dsRNA da microplusina e defensina e quantificação da MSP4 de <i>Anaplasma marginale</i>	66
Tabela 6 - Comparação da sequência dos contíguos 66 ⁽¹⁾ e 73 ⁽²⁾ obtidos com o alinhamento das sequências virais identificadas na biblioteca de genes diferencialmente expressos nas células BME26 infectadas com <i>A. marginale</i> com sequências de outras espécies de vírus.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

DEPC: dietilpirocarbonato

dsRNA: duplas fitas de RNA

DTT: ditionitrito

EDC: 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreto

ERO: espécies reativas de oxigênio

ESTs : Produção de etiquetas de seqüências transcritas

h: horas

IPTG: isopropiltio α galactosídeo

LB: meio de cultura Luria-Bertani

LPS: lipopolissacarídeo

M: mol/L

min: minutos

NL₂: nitrogênio líquido

PCR: **Reação em cadeia da polimerase**

PBS: tampão fosfato salino

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNAi: RNA de interferência

RT-PCR: reação em cadeia de polimerase (PCR) com transcrição reversa (RT)

RPM: rotações por minuto

s: segundos

TBE: tampão tricina-borato-EDTA

TE: tampão tricina-EDTA

TSR: "template suppression reaction"

Xgal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β D-galactosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	20
1.2 <i>Anaplasma marginale</i>	22
1.3 Sistemas <i>in vitro</i> de cultivo celular	23
1.4 Sistema imune de invertebrados	24
2 OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Material Biológico	32
3.1.1 Células embrionárias BME26	32
3.1.2 Microorganismos	33
3.2 Oligonucleotídeos	33
3.3 Microscopia.....	36
3.4 Imunomarcção da microplusina nas células BME26	37
3.5 Estabelecimento da infecção de <i>Anaplasma marginale</i> na cultura de células BME26	38
3.6 Avaliação da expressão gênica dos AMPs em células BME26	39
3.6.1 Estímulo com microorganismos inativados por calor e lipopolisacarídeo (LPS).....	39
3.6.2 Infecção com <i>Anaplasma marginale</i>.....	39
3.7 Extração de RNA e DNA.....	40
3.8 Síntese de cDNA	40
3.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	41
3.10 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)	41
3.11 Análise do DNA	42
3.11.1 Extração e purificação do DNA do gel de agarose.....	42
3.11.2 Ligação no vetor pGEM® T e transformação de <i>Escherichia coli</i> DH5α..	42
3.11.3 Purificação dos plasmídeos	43
3.11.4 Sequenciamento	43
3.12 Construção das Bibliotecas	43
3.12.1 Produção de etiquetas de seqüências transcritas (ESTs).....	43

3.12.2 Bibliotecas Subtrativas.....	44
3.13 Silenciamento gênico dos AMPs através de RNA de interferência (RNAi) ..	45
3.13.1 Produção das duplas fitas de RNA (dsRNA)	45
3.13.2 Tratamento das células BME26 com dsRNA dos AMPs e infecção com <i>Anaplasma marginale</i>	46
3.13.3 Avaliação do silenciamento gênico das células BME26 tratadas com dsRNA dos AMPs	46
3.13.4 Quantificação das riquetsias em células tratadas com dsRNA e infectadas com <i>Anaplasma marginale</i>	47
3.14 Avaliação da expressão do gene codificador da proteína do capsídeo viral em células BME26	47
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Caracterização das células embrionárias BME26	49
4.1.1 Origem das células BME26.....	49
4.1.2 Caracterização morfológica das células BME26	50
4.1.3. Caracterização da função de defesa das células BME26	54
4.1.4 Caracterização molecular das células BME26.....	56
4.2 Estabelecimento da infecção das células BME26 com <i>A. Marginale</i> (UFMG1)	58
4.3 Avaliação da expressão gênica dos AMPs em células BME26 frente a diferentes desafios microbianos	61
4.4 Silenciamento dos genes que codificam os AMPs sobre a infecção das celulas BME26 por <i>A. marginale</i>	65
4.5 Expressão diferencial dos genes das células BME26 após infecção com <i>A.</i> <i>marginale</i>	66
5 DISCUSSÃO	72
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXOS – TRABALHOS PUBLICADOS	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Carrapatos são importantes vetores de doenças, ultrapassando até mesmo os insetos hematófagos na grande variedade de doenças transmitidas (DE LA FUENTE *et al.*, 2008, SONENSHINE e HYNES, 2008). O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasita hematófago de grande importância médico-veterinária. É um carrapato monoxeno que apresenta uma preferência de alimentação pelo hospedeiro bovino, causando significativas perdas econômicas em várias regiões pecuárias de clima tropical e subtropical (GONZALES, 1995, LABRUNA e VERISSÍMO, 2001). Os prejuízos causados à pecuária envolvem a alta ingestão de sangue do hospedeiro durante a alimentação do carrapato comprometendo a produção de carne e leite (JONSSON *et al.*, 1998). A picada do carrapato causa irritabilidade e desconforto ao boi, provocando estresse ao animal, que combinado com a hematofagia e com as grandes infestações, pode levar o bovino à morte (GONZALES, 1995, HORN, 1983). Além disso, as lesões produzidas no couro do animal causam cicatrizes irreversíveis e diminuem o seu valor comercial. Dados da EMBRAPA (2000) mostraram que só no Brasil, os prejuízos causados por este carrapato chegam a somar quase um bilhão de dólares por ano.

No Brasil e em outras regiões da América Latina o carrapato *R. (B.) microplus* é o principal vetor da riquetsia *Anaplasma marginale*, sendo responsável também pela transmissão do protozoário *Babesia spp*, que juntos formam o complexo conhecido como “tristeza parasitária bovina” (GONZALES, 1995). Apesar do carrapato *R. (B.). microplus* realizar várias ecdises num mesmo animal, já foi mostrado que nesse período ao procurarem um novo local para fixar-se e reiniciar a alimentação, podem mudar de hospedeiro. Essa mobilidade, portanto propicia a transmissão de patógenos, além disso, os machos, por se alimentarem em vários hospedeiros e por sua longevidade, são importantes disseminadores de infecção (KESSLER, 2001, MASON, 1981). Algumas medidas terapêuticas, tais como, o uso de acaricidas têm sido empregadas na erradicação desse ectoparasita, Muitas vezes, porém mostram-se ineficazes, visto que os carrapatos desenvolvem rápida

resistência aos compostos desses produtos, além de trazerem desvantagens como a contaminação do meio ambiente e dos produtos alimentícios de origem animal (LABARTA *et al.*, 1996).

Outra medida profilática empregada no controle de infestações causadas por *R. (B.) microplus* é o uso de vacinas. Ao longo dos últimos 20 anos alguns candidatos a vacinas foram desenvolvidos por vários grupos de pesquisa (DE LA FUENTE *et al.*, 1988, WILLADSEN e KEMP, 1989, RODRIGUEZ *et al.*, 1995, WILLADSEN e JONGEJAN, 1999, PATARROYO *et al.*, 2002). Vacinas contra carrapatos utilizando uma proteína purificada a partir do epitélio intestinal *R. (B.) microplus*, denominada Bm86, foram utilizadas em vários países da América Latina (DE LA FUENTE, ALMAZAN *et al.*, 2007). A Bm86 é comercializada através da vacina TickGARD™ (Biotech) na Austrália (WILLADSEN *et al.*, 1995) e Gavac™ (Heber Biotec S. A.) em Cuba (DE LA FUENTE *et al.*, 1988). No Brasil, estima-se que houve uma redução entre 45% e 60% no percentual de infestação em bovinos imunizados com a Bm86 e submetidos à infestação natural com *B. microplus* (RODRIGUEZ *et al.*, 1995). Outros três peptídeos sintéticos derivados de diferentes regiões da proteína Bm86 (SBm4912, SBm7462 e SBm19733) foram utilizados na imunização de bovinos. Estes peptídeos reduziram o número e o peso das teleóginas (fêmeas completamente ingurgitadas e fecundadas), assim como a capacidade de oviposição, sendo que o peptídeo sintético SBm7462 apresentou a maior eficiência, conferindo uma proteção aos animais em torno de 81% (PATARROYO *et al.*, 2002). A partir dos ovos do carrapato *R. (B.) microplus* foi purificada uma glicoproteína de 50 kDa, denominada BYC - *Boophilus* *Yolk* *pro-Cathepsin* (LOGULLO *et al.*, 1998), que mostrou uma redução de peso e da capacidade de oviposição pelas fêmeas de 14% a 36% em carrapatos alimentados em bovinos imunizados com esta proteína (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998). Porém, apesar de todos os esforços empregados, ainda não foi encontrada uma molécula capaz de conferir imunidade com eficácia aos bovinos contra o *R. (B.) microplus* e, conseqüentemente, evitar os patógenos por ele transmitidos.

1.2 *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória que pertence a família *Anaplasmataceae*, ordem *Rickettsiales* (DUMLER *et al.*, 2001) e é o agente etiológico da doença bovina *anaplasmosse*. Desenvolve-se exclusivamente dentro de vacúolos parasitóforos, tanto nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, como em células do intestino e da glândula salivar do carrapato. Nos eritrócitos, as riquetsias se desenvolvem dentro de inclusões, também chamadas de corpos iniciais, que contém de 4 a 8 riquetsias, que chegam a alcançar 70% ou mais de eritrócitos infectados na fase aguda da parasitemia. Os eritrócitos infectados são posteriormente fagocitados pelas células reticuloendoteliais, resultando em uma anemia leve ou grave e icterícia. A fase aguda da infecção é caracterizada pela perda de peso do animal, febre, aborto, diminuição da produção de leite e morte (KOCAN *et al.*, 2009)

A riquetsia *A. marginale* está amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo, Europa, África, Ásia e Austrália (KOCAN *et al.*, 2004). A transmissão pode ocorrer por via mecânica através do sangue contaminado presente nas peças bucais de insetos hematófagos (moscas, mosquitos, tabanídeos) (HAWKINS *et al.*, 1982), ou ainda através de instrumentos contaminados utilizados na manipulação dos animais (KOCAN *et al.*, 2009). Biologicamente, a transmissão ocorre através de carrapatos, sendo que mais de 20 espécies em todo o mundo já foram apontadas como vetores de *A. marginale* (KOCAN *et al.*, 2004). Nos Estados Unidos, os principais carrapatos vetores de *A. marginale* são *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* e *Dermacentor albipictus*, enquanto que em regiões tropicais e subtropicais do mundo é o carrapato *R. (B.) microplus* e *R. annulatus* (KOCAN *et al.*, 2008). O ciclo de desenvolvimento da *A. marginale* já foi descrito em carrapatos da espécie *Dermacentor andersoni* (KOCAN, GOFF *et al.*, 1992, KOCAN, STILLER *et al.*, 1992), é bastante complexo e coordenado pela alimentação do carrapato. Os eritrócitos infectados são ingeridos na alimentação sangüínea pelo carrapato, sendo que as células intestinais e outros tecidos do carrapato são rapidamente infectados pelo patógeno, incluindo a glândula salivar, que irá transmitir a riquetsia para o hospedeiro vertebrado na próxima alimentação. Nos tecidos infectados do carrapato, a bactéria se multiplica dentro dos

vacúolos, passando primeiramente por uma forma reticulada ou vegetativa, que se divide por fissão binária, formando vacúolos ou colônias no citoplasma das células contendo milhares de organismos. Essa forma reticulada se transforma então numa forma densa, que é a forma infectiva do patógeno, a qual poderá ser transmitida pelo carrapato através da alimentação sangüínea (KOCAN, GOFF *et al.*, 1992, KOCAN, STILLER *et al.*, 1992).

A anaplasnose bovina causa consideráveis perdas econômicas devido aos altos índices de morbidade e mortalidade dos rebanhos bovinos susceptíveis. Os principais parâmetros utilizados para contabilizar essas perdas são: baixo ganho de peso, diminuição na produção de leite, mortalidade e o próprio custo do tratamento da doença (KOCAN *et al.*, 2003). Medidas de controle da *anaplasnose* incluem o controle de artrópodes através da aplicação de acaricidas e a profilaxia através da administração de antibióticos e vacinação. Dentre essas medidas, as vacinas têm sido a maneira mais efetiva de controle, pelo menos parcial, da anaplasnose bovina, sendo que atualmente são aplicadas vacinas vivas ou mortas. Em ambos os casos as vacinas induzem uma resposta imune protetora que reduz ou pode até prevenir a doença. Porém não impedem que o bovino desenvolva uma infecção contínua, sendo que esse tipo de infecção é a que mais contribui para disseminar a doença, pois o bovino torna-se um reservatório para transmissão mecânica ou ainda uma fonte de infecção para carrapatos (KOCAN *et al.*, 2003).

1.3 Sistemas *in vitro* de cultivo celular

Carrapatos são parasitas de grande importância econômica mundial, tanto pelo próprio parasitismo causado, quanto pela sua capacidade vetorial na transmissão de vírus, bactérias e protozoários de importância médico-veterinária (JONGEJAN e UILENBERG, 2004). O desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* a partir de tecidos dos hospedeiros e vetores, principalmente linhagens contínuas, tem contribuído de maneira significativa para a pesquisa sobre carrapatos, incluindo o conhecimento sobre a biologia desse parasita e a interação hospedeiro-vetor-patógeno. Além disso, vem possibilitando a produção de antígenos para utilização em testes diagnósticos (SALIKI *et al.*, 1998) e para o

desenvolvimento de vacinas (BLOUIN *et al.*, 1998, KOCAN *et al.*, 2001, DE LA FUENTE *et al.*, 2002, KOCAN *et al.*, 2007).

Ao longo dos últimos 30 anos, após o estabelecimento da primeira linhagem de células do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus* a partir de tecidos (VARMA *et al.*, 1975), muitas outras linhagens surgiram, principalmente após a introdução do meio para cultivo L-15 (Leibovitz) e L15 modificado (L-15B) (MUNDERLOH e KURTTI, 1989). Atualmente estão sendo cultivadas em diferentes laboratórios no mundo mais de 40 linhagens celulares, que foram estabelecidas a partir de 13 espécies de ixodídeos de importância médico-veterinária (BELL-SAKYI *et al.*, 2007). As culturas de células de carrapatos têm sido amplamente utilizadas para propagação de vários patógenos, incluindo vírus e bactérias de importância médico-veterinária (BELL-SAKYI *et al.*, 2007). O cultivo de importantes cepas dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* tem sido vastamente explorado em células de carrapato. Em células embrionárias do carrapato *Ixodes scapularis* (IDE8) (MUNDERLOH *et al.*, 1994) foi propagado com sucesso o cultivo da riquetsia *A. marginale* (MUNDERLOH, BLOUIN *et al.*, 1996, BLOUIN e KOCAN, 1998, BLOUIN *et al.*, 2000), sendo que o desenvolvimento das riquetsias foi similar ao que já foi reportado em carrapatos naturalmente infectados (BLOUIN *et al.*, 2002). Os isolados cultivados nas culturas de células continuam sendo infectantes tanto para bovinos, como para os carrapatos, que se alimentam desses bovinos. Além disso, as riquetsias cultivadas *in vitro* conservam as mesmas proteínas de superfícies (MSPs) que já foram identificadas nas que se desenvolvem nos eritrócitos do bovino, e que lhes confere a identidade antigênica (BLOUIN *et al.*, 2002). A cultura de células IDE8 também foi utilizada para a propagação de outros patógenos tais como: *Ehrlichia equi*, o agente etiológico da erliquiose granulocítica, *Ehrlichia phagocytophila* (MUNDERLOH, MADIGAN *et al.*, 1996, MUNDERLOH *et al.*, 1999), *Ehrlichia canis* (KOCAN, 1998), e *E. ruminantium* (BELL-SAKYI *et al.*, 2000, BELL-SAKYI, 2004).

1.4 Sistema imune de invertebrados

O sistema imune dos invertebrados é bastante simples quando comparado ao de vertebrados, pois não possui memória imunológica, nem anticorpos (BULET *et*

al., 2004). A cutícula e os epitélios de revestimento atuam como as primeiras linhas de defesa desses animais, e uma vez que essas barreiras são transpostas, mecanismos de defesa são desencadeados, com o objetivo de eliminar o microorganismo invasor. As respostas desencadeadas nos invertebrados compreendem a ativação de cascatas proteolíticas, tais como coagulação e melanização, a fagocitose, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio, além de um vasto repertório de peptídeos antimicrobianos (NAPPI e OTTAVIANI, 2000, BULET *et al.*, 2004, IWANAGA e LEE, 2005).

Peptídeos com atividade antimicrobiana são amplamente encontrados entre os seres vivos, desde bactérias até animais e plantas (AKIRA *et al.*, 2006), (IWANAGA e LEE, 2005). São moléculas de pequena massa molecular (menores 10 kDa), catiônicos e anfipáticos. O modo de atuação dos AMPs de modo geral envolve a permeabilização da membrana plasmática dos microorganismos (Hof *et al.*, 2001), embora possam atuar também sobre alvos intracelulares, inibindo a atividade de enzimas, impedindo a síntese de DNA, de RNA e de proteínas, ou ainda alterando a divisão celular (GOUMON *et al.*, 1996, BROGDEN, 2005, YOUNT *et al.*, 2006).

Em invertebrados, peptídeos com ação antimicrobiana são sintetizados principalmente em tecidos como a glândula salivar, o trato reprodutivo, o trato digestório, os hemócitos e o corpo gorduroso, e secretados para a hemolinfa (Hancock *et al.*, 2006). A expressão gênica dos AMPs pode ser constitutiva ou induzida após uma infecção por microorganismos, ou ainda por moléculas componentes da superfície dos microorganismos, tais como lipopolissacarídeo (LPS) (BULET *et al.*, 2004). Na mosca de frutas *Drosophila melanogaster*, o mecanismo de indução da expressão desses AMPs é regulada por duas vias de sinalização intracelular denominadas de Toll e Imd (HOFFMANN e REICHHART, 2002). As infecções causadas por fungos e bactérias Gram-positivas estimulam a via Toll e culminam na expressão gênica das drosomicinas, metchnikovinas e defensinas, enquanto que as infecções causadas por bactérias Gram-negativas estimulam a via Imd e culminam na expressão gênica das atacinas, cecropinas, dipterocinas e drosocinas (LECLERC e REICHHART, 2004). Em outros insetos também já foram identificados vários transcritos pertencentes às estas vias de regulação (SCHLUNS e CROZIER, 2007).

Assim como os insetos e outros invertebrados, carrapatos possuem um sistema imune capaz de lhes conferir proteção contra agentes invasores. Porém,

comparativamente aos insetos, pouco se conhece do sistema imune de carrapatos (SONENSHINE e HYNES, 2008). A hemolinfa dos carrapatos desempenha importante papel na resposta imune celular desses animais, principalmente pelo processo de fagocitose que é realizado pelos hemócitos, células circulantes da hemolinfa. No carrapato *R. (B.) microplus* foram identificadas duas populações de hemócitos, os granulócitos e os plasmatócitos, sendo que após o desafio com leveduras, foi observado o processo de fagocitose sendo realizado pelos plasmatócitos (PEREIRA *et al.*, 2001). Na hemolinfa do carrapato *Ornithodoros moubata*, foram identificadas três populações de hemócitos: os prohemócitos, os granulócitos e os plasmatócitos, sendo os dois últimos responsáveis pela fagocitose (Ionue *et al.*, 2001). Além da resposta celular, vários peptídeos com atividade antimicrobiana foram identificados nos carrapatos (TAYLOR, 2006), tais como as defensinas no carrapato *O. moubata* e *Dermacentor variabilis* (Nakajima *et al.*, 2001, Nakajima *et al.*, 2002, JOHNS *et al.*, 2001). No carrapato *D. variabilis* Sonenshine e colaboradores demonstraram a indução de peptídeos *defensin-like* no intestino de carrapatos infectados com *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Borrelia burgdorferi* (SONENSHINE *et al.*, 2002). Não somente no intestino, mas também nos hemócitos de *D. variabilis*, foi identificada a expressão de uma defensina. Os autores sugerem que o peptídeo é armazenado nos hemócitos e liberado para hemolinfa frente a uma infecção (CERAUL *et al.*, 2003).

Ao longo dos últimos anos, nosso grupo de pesquisa caracterizou vários peptídeos com atividade antimicrobiana no carrapato *R. (B.) microplus*. Do conteúdo intestinal foi purificado um peptídeo antimicrobiano que corresponde à região 33-61 da cadeia α da hemoglobina bovina. O peptídeo sintético apresentou atividade antimicrobiana contra várias cepas de bactérias Gram-positivas e de fungos (FOGACA *et al.*, 1999), causando permeabilização da membrana de *Micrococcus luteus* (SFORCA *et al.*, 2005) e *Candida albicans* (MACHADO *et al.*, 2007). Dos hemócitos de fêmeas ingurgitadas foram purificados dois peptídeos com ação antibacteriana, sendo que um deles mostrou similaridade com as defensinas de artrópodes (FOGACA *et al.*, 2004) e o outro, denominado ixodidina, apresentou similaridade com inibidores de serina-proteinases, tendo exibido atividade contra quimotripsina e elastase (FOGACA *et al.*, 2006). A partir da hemolinfa livre de células de fêmeas de *R. (B.) microplus* e ovos foi purificado um peptídeo antimicrobiano, denominado microplusina, com massa molecular de 10.204 Da

(FOGACA *et al.*, 2004, ESTEVES *et al.*, 2009). Na hemolinfa do carrapato *Amblyomma hebraeum* foi isolado um peptídeo antimicrobiano denominado hebraína que possui alta identidade (62%) com microplusina e é ativo contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Além disso, a expressão gênica da hebraína foi observada em gânglios nervosos do carrapato *A. hebraeum* (LAI *et al.*, 2004). Em outras espécies de carrapato, tais como *A. americanum* (MULENGA *et al.*, 2007), *Ornithodoros coriaceus*, *O. parkeri* e *Argas monolakensis* (MANS *et al.*, 2008) foi observada a expressão gênica de peptídeos *microplusin-like* na glândula salivar.

A expressão gênica constitutiva da microplusina foi detectada nos hemócitos, corpo gorduroso, ovários e ovos do carrapato *R. (B.) microplus*, já os principais sítios de expressão gênica da defensina são os hemócitos e o corpo gorduroso (FOGACA *et al.*, 2004, ESTEVES *et al.*, 2009). A expressão gênica da microplusina foi avaliada em ovários e ovos de fêmeas do carrapato em diferentes estágios de desenvolvimento. A transcrição gênica do peptídeo atinge altos níveis em ovários de fêmeas que iniciam a postura dos ovos, e ao longo do desenvolvimento do embrião apresenta grande variação, atingindo altos níveis de expressão novamente no final da embriogênese (ESTEVES *et al.*, 2009). A presença da microplusina foi detectada no tubo conectivo do ovário, uma região que liga o útero à vagina, e entre os grânulos de vitelo no interior dos ovócitos. Esses resultados sugerem fortemente que a microplusina exerça um papel de proteção não somente contra patógenos que atingem a hemocele, como também o trato reprodutivo e os ovos do carrapato *R. (B.) microplus* (ESTEVES *et al.*, 2009).

Com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação da microplusina, o peptídeo foi produzido recombinantemente e os resultados mostraram que além da atividade *anti-M. luteus*, a microplusina também é ativa contra várias cepas de bactérias Gram-positivas e de fungos, porém não apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas. Além disso, foi mostrado que a atividade da microplusina contra *M. luteus* se dá através da sua habilidade de ligar-se ao Cu^{2+} , acarretando em uma deficiência respiratória para a bactéria (SILVA *et al.*, 2009). Análises por ESI-MS (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) da microplusina incubada com diferentes metais mostrou que, além do cobre, esse peptídeo é capaz de ligar-se também a ferro. A propriedade de ligar-se ao ferro indica que além de sua função já identificada como peptídeo antimicrobiano, a microplusina pode exercer um papel na homeostase do

ferro em carrapatos, como foi visto em camundongos e humanos, com o peptídeo antimicrobiano hepcidina (VERGA FALZACAPPA e MUCKENTHALER, 2005).

2 OBJETIVOS

Alguns aspectos do sistema imune do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* já foram elucidados pelo nosso grupo de pesquisa. Foram isolados e caracterizados vários AMPs deste carrapato (FOGACA *et al.*, 1999, FOGACA *et al.*, 2004, FOGACA *et al.*, 2006, ESTEVES *et al.*, 2009), além de ter sido demonstrada a participação dos hemócitos na defesa contra microorganismos através da fagocitose e da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (PEREIRA *et al.*, 2001). Porém, frente à infecção com patógenos naturalmente transmitidos pelo carrapato, não sabemos como esses processos imunes se comportam. O carrapato *R. (B.) microplus* é um hematófago que se alimenta preferencialmente de sangue bovino. Portanto, para elucidarmos aspectos envolvidos na interação do carrapato e os microorganismos que ele transmite, seria necessário manter a infecção em um bovino. Em razão das dificuldades em manter um biotério de bovinos, optamos inicialmente em trabalhar com células embrionárias (BME26) do carrapato *R. (B.) microplus*, que é uma ferramenta de fácil manejo e manutenção, e largamente utilizada na pesquisa sobre a interação carrapato-patógeno (BELL-SAKYI *et al.*, 2007). Dentro desse enfoque estabelecemos, os seguintes objetivos:

1. Realizar a caracterização morfo-funcional das células BME26.
2. Estabelecer a infecção da riquetsia *Anaplasma marginale* nas células BME26.
3. Avaliar a modulação da expressão gênica dos AMPs, microplusina, defensina e ixodidina, frente à infecção com *A. marginale*.
4. Avaliar os níveis de expressão gênica dos AMPs, microplusina, defensina, ixodidina, frente a diferentes estímulos microbianos.
5. Avaliar a importância dos peptídeos antimicrobianos microplusina, defensina e ixodidina no controle da infecção de *A. marginale* pelas células BME26.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

3.1.1 Células embrionárias BME26

No presente trabalho foram utilizadas células embrionárias da linhagem BME26 do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, cedidas pelo Prof. Timothy J. Kurtti, Department of Entomology, University of Minnesota, Saint Paul. Para a caracterização morfológica e molecular, as células foram mantidas em meio de cultura Leibovitz (Invitrogen, EUA) modificado (MUNDERLOH e KURTTI, 1989), porém com um percentual de 10% de soro fetal bovino e sem a adição de colesterol (ESTEVES *et al.*, 2008). Para o restante dos experimentos foi utilizado o meio de cultura descrito por (MUNDERLOH e KURTTI, 1989). As células foram mantidas em frascos de cultivo de 25 cm² Nunc™ (Thermo Fisher Scientific, EUA), em uma estufa incubadora BOD (Fanem, SP, Brasil) a uma temperatura de 34 °C. O meio de cultura foi trocado semanalmente. As células foram subculturadas em uma concentração inicial de 8×10^5 células/mL, a cada 60 dias, quando atingiam a confluência com aproximadamente $1,5 \times 10^7$ /mL.

A preparação das células BME26 para os ensaios descritos neste trabalho foi iniciada com a remoção das mesmas do frasco de cultivo com o auxílio de uma cânula de 10 cm x 14 mm de diâmetro (Becton Dickinson, Estados Unidos) acoplada a uma seringa de 5 mL. Para isso, o meio de cultura foi aspirado do frasco de cultivo e desprezado contra a superfície interna do mesmo, causando o descolamento das células. As células em suspensão foram coradas com uma solução a 4% de azul de tripan (Sigma-Aldrich, EUA), preparado em água destilada, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. As células, em seguida, foram transferidas para tubos de cultivo ou para placas de cultivo com 24 poços (tubos e placas da Nunc™, Thermo Fisher Scientific), de acordo com o ensaio a ser realizado.

Alternativamente, as células foram depositadas sobre lamínulas de vidro, inseridas nos poços da placa de cultivo.

3.1.2 Microorganismos

Os microorganismos utilizados foram: *Enterobacter cloacae* β -12 (bactéria Gram-negativa), proveniente da Universidade de Estocolmo, Suécia, *Micrococcus luteus* (bactéria Gram-positiva), proveniente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann), e a riquetsia *Anaplasma marginale*, cepa UFMG1 com apêndice (RIBEIRO *et al.*, 1997), que nos foi cedida pelo Prof.^o Dr. Múcio Ribeiro, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esta riquetsia vem sendo cultivada pelo grupo do Dr Múcio em células embrionárias do carrapato *Ixodes scapularis* (IDE8) (BASTOS *et al.*, 2006).

3.2 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para as reações em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou quantitativas (qPCR) (**Tabela 1**) e os oligonucleotídeos utilizados para a síntese de dupla fita de RNA (dsRNA) (**Tabela 2**) foram confeccionados pela Invitrogen (São Paulo, Brasil).

Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para as PCR e qPCR.

Nome	Sequência	Programa térmico
Microplusina	senso 5' TGA AGG CCAT CTT CGT GTC CG 3' antisenso 5' TGG TCG TGC TCA TGG TGG GCT TC3'	30 s a 94°C, 30 s a 55 °C e 7 min a 72 °C (35 ciclos).
Defensina	senso 5' GCA AGA AGG TTG CTA AAA TGC G 3' antisenso 5' TGC TAA AGT AAA GCG CAG TGT3'	30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 30 s a 72 °C (37 ciclos)
Ixodidina	senso 5'CAA AAT GCA GTC CCG TTA CGT3' antisenso 5'TGC CGC ACT GGT TGA AGA C 3'	30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 30 s a 72 °C (37 ciclos)
M13	senso 5'-GTA AAA CGA CGC CCA GT-3' antisenso 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	15 seg a 96 °C, 15 seg a 50 °C , 4 min a 60 °C
MSP4	senso 5'-GAC GTG CTG CAC ACA GAT TT-3' antisenso 5'-CAC CTG CCA CCA AGG ATA TT-3'	40 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e 1min a 72 °C (40 ciclos)
PER 1 e 2	senso 5'-TTT ATC GCT ATT AGA TGA GCC TAT G-3' antisenso 5'-CTC TAC ACT AGG AAT TCC GCT AT-3'	30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C e 30 s a 72 °C (35 ciclos)
CV	senso 5'-AAG CGG GGT AGA ACA TTG TG-3' antisenso 5'-CTC CAA GAC TGC ACC TCT CC-3'	40 s a 94 °C, 30 s a 63 °C e 30 s a 72 °C (35 ciclos)
Oligo dT (Anchor)	5'-GAC TTC GAG TCG ACA TCG ATT TTT TTT TTT TT-3')	90 min a 50 °C
MicRT	senso 5'-CAG TGA AGC CTT CGC ATC AG-3' antisenso 5'-CCG AAG TCG AAG CCA CAA G-3'	40 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e 1 min s a 72 °C (40 ciclos)
DefRT	senso 5'-GAT GCC CGT TTA ACC AAG GA-3' antisenso 5'-TTG ATT AGG CCA GCG CAG TA-3'	40 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e 1 min a 72 °C (40 ciclos)
IxoRT	senso 5'-CAA AAT GCA GTC CCG TTA CGT-3' antisenso 5'-CCA CGA CGG CAG AAG CAT CC-3'	40 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e 1 min a 72 °C (40 ciclos)
SubRT	senso 5'-GCT TGC GCA ACA TTA AAG CGA AC-3' antisenso 5'-TTT GGT CGT ACG TAA ACT TGA CAA ATG TG-3'	40 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e 1 min a 72 °C (40 ciclos)
RibRT S3A	senso 5'-GGA CGA CCG ATG GCT ACC T-3' antisenso 5'-TGA GTT GAT TGG CGC ACT TCT-3'	40 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e 1 min a 72 °C (40 ciclos)

Tabela 2 - Sequencias dos oligonucleotídeos utilizados para a síntese de dsRNA, acrescidos da seqüência promotora T7 (destacada em vermelho).

<i>Nome</i>	<i>Sequência</i>	<i>Programa térmico (temperatura de anelamento em negrito)</i>
<i>dsMIC</i>	senso 5'- TAATACGACTCACTATAGGGTACT ATG AAG GCC ATC TTC GTG TC-3' antisenso 5'- TAATACGACTCACTATAGGGTACT TTA ATG GTC GTG CTC ATG GT-3'	30 s 94 °C, 30 s a 63 °C e 1 min a 68 °C (35 ciclos)
<i>dsDEF</i>	senso 5'- TAATACGACTCACTATAGGGTACT GAT GCC CGT TTA ACC AAG GA-3' antisenso 5'- TAATACGACTCACTATAGGGTACT TTG ATT AGG CCA GCG CAG TA-3'	30 s 94 °C, 30 s a 63 °C e 1 min a 68 °C (35 ciclos)
<i>dsSUB</i>	senso 5'- TAATACGACTCACTATAGGGTACT GCT TGC GCA ACA TTA AAG CGA AC-3' antisenso 5'- TAATACGACTCACTATAGGGTACT TTT GGT CGT ACG TAA ACT TGA CAA ATG TG-3'	30 s 94 °C, 30 s a 63 °C e 1 min a 68 °C (35 ciclos)
<i>dsIXO</i>	senso 5'- TAATACGACTCACTATAGGGTACT CAAAATGCAGTCCCGTTACGT-3' antisenso 5'- TAATACGACTCACTATAGGGTACT TGCCGCACTGGTTGAAGAC-3'.	30 s 94 °C, 30 s a 63 °C e 1 min a 68 °C (35 ciclos)

3.3 Microscopia

As células BME26 foram caracterizadas morfológicamente através de microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para a microscopia de fluorescência, as células BME26 foram depositadas sobre lâminulas inseridas em poços de placas de cultivo e incubadas por 1 min com os seguintes marcadores: rodamina 123 (Sigma) (1 µg/mL), laranja de acridina (Sigma) (30 µg/mL) e P96 (Sigma) (10 mM) preparados em sulfóxido de dimetil (DMSO) e diluídos 1000 x em meio de cultura de células. Após a incubação as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS1: Na₂HPO₄ 10 mM; pH 7,2; NaCl 10 mM) e observadas sob contraste de interferência diferencial (DIC) em microscópio Axioplan 2 (Zeiss, Alemanha). Foram utilizados os seguintes filtros: Zeiss-09 (BP450-490nm/FT510nm/LP515nm), Zeiss-15 (BP546/12nm/FT580nm/LP590nm), Zeiss-01 (BP365/12nm/FT395nm/LP397nm).

Nos experimentos de endocitose, o paládio meso-porfirina IX (Pd-mP) (Porphyrin Products Inc. Logan) e a hemoglobina (Sigma) foram previamente marcados com rodamina como descrito por Lara e colaboradores (LARA *et al.*, 2005). As células sobre as lamínulas foram incubadas com hemoglobina ou Pd-mP em meio de cultura a uma concentração final de 1 mg/mL e 100 mM, respectivamente. As células foram incubadas por 24 h a 34 °C em BOD (Fanem), lavadas por três vezes com PBS1 e, a seguir, observadas em microscópio Axioplan 2 (Zeiss). As imagens foram obtidas utilizando-se os filtros: Zeiss-15 (BP546/12nm/FT580nm/LP590nm) e BP410nm/FT510nm/LP520nm). Alternativamente, as células foram incubadas com hemoglobina não marcada e marcada com rodamina em uma proporção de 100 µg:1 µg, seguindo o mesmo protocolo de incubação descrito acima.

Para a MET, as células BME26 foram fixadas em 2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4, pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio por 2 h e embebidas em resina Spurr (Sigma). Foram realizados cortes ultrafinos (70 nm) que foram contrastados com 2% de acetato de uranila e 0,5% de citrato de chumbo (SILVA *et al.*, 1999). Os cortes foram examinados em microscópio eletrônico Jeol 100 CX (Jeol, EUA).

Nos ensaios de fagocitose foi utilizada a microscopia de fluorescência e eletrônica. Cem microlitros de uma suspensão de $3,7 \times 10^6$ leveduras/mL em tampão fosfato-salino (PBS1) foram incubadas com 1 μ L do Cytotracker (Sigma) por 15 min a 34 °C. Em seguida, esta preparação foi lavada por centrifugação com 500 μ L de meio de cultura. As células BME26 foram incubadas com 490 μ L de meio de cultura e 10 μ L da suspensão de leveduras marcada com Cytotracker, em uma multiplicidade de infecção (MOI) de uma levedura para uma célula e incubadas por 24 h em BOD (Fanem) a 34 °C. Findo o período de incubação, as células foram coletadas da placa de cultivo, lavadas com tampão fosfato-salino (PBS1) por centrifugação, fixadas com paraformaldeído 4% por 10 min e observadas em microscópio Axioplan 2 (Zeiss). Na microscopia eletrônica foi realizado o mesmo procedimento descrito para a fluorescência, exceto pela marcação da levedura.

3.4 Imunomarcação da microplusina nas células BME26

Foram utilizados para a produção do soro anti-microplusina quatro camundongos da linhagem BALB/C, mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A microplusina recombinante produzida em *E. coli* (ESTEVES *et al.*, 2009) foi ligada covalentemente a hemocianina, uma proteína de hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, purificada em nosso laboratório. Para a reação de acoplamento utilizamos o reagente 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreto (EDC/10 mg/mL), de acordo com a metodologia previamente descrita por Lorenzini e colaboradores (LORENZINI *et al.*, 2003). Foram administradas três injeções de 20 μ g de microplusina + 100 μ g de hemocianina, em intervalos de quinze dias, sendo que na primeira dose foi utilizado o adjuvante de Freund completo (Sigma) e nas doses seguintes o adjuvante de Freund incompleto (Sigma). O soro pré-imune foi coletado dos camundongos através de punção retro-orbital. A sangria total foi realizada quinze dias após a última injeção através de ruptura da veia cava. O sangue coletado foi mantido a 37 °C por 1 h seguida da incubação a 4

°C por 12 h para retração do coágulo. O soro foi obtido por centrifugação a 100 x g por 5 min. Em todos os procedimentos que envolveram coleta de sangue, os animais foram previamente anestesiados em câmara de gás carbônico. Os ensaios de imunofluorescência foram realizados como descrito previamente por Fukuzawa e colaboradores (FUKUZAWA *et al.*, 2008), com exceção do anticorpo secundário que no presente trabalho foi utilizado o anti-IgG de camundongo conjugado com Texas Red (Amersham Biosciences, EUA).

3.5 Estabelecimento da infecção de *Anaplasma marginale* na cultura de células BME26

O inóculo inicial de *A. marginale* foi proveniente de células do carrapato *Ixodes scapularis* (IDE8), cedidas pelo Prof.^o Dr. Múcio Ribeiro (UFMG), com aproximadamente 60% de infecção. As células IDE8 infectadas foram transferidas para tubos de propileno de 15 ml, e rompidas através da imersão dos tubos em nitrogênio líquido (NL₂) por 2 min para a liberação das riquetsias. Em seguida, a preparação foi mantida até o descongelamento em um banho úmido a 37 °C. Alíquotas de 500 µL foram transferidas para frascos de cultivo contendo uma monocamada de células BME26, adicionando-se 4,5 mL de cultivo para *Anaplasma* descrito por Munderloh e colaboradores (MUNDERLOH, BLOUIN *et al.*, 1996). O monitoramento da infecção foi iniciado dois dias após a adição do inóculo através de microscopia óptica. Para isso, uma alíquota de células BME26 infectadas foi retirada do frasco de cultivo e centrifugada em uma centrífuga Cytospin[®] (Fanem) por 5 min a 1000 rpm. Em seguida as células foram coradas com o corante Panóptico (Instant Prove, Brasil) e observadas em microscópio Zeiss–Axiofhot (Zeiss). A infecção foi confirmada através da amplificação de um fragmento da subunidade 16S do rDNA de *A. marginale* (GOODMAN *et al.*, 1996) por PCR (**item 3.9**), a partir do DNA genômico extraído de células BME26 infectadas.

3.6 Avaliação da expressão gênica dos AMPs em células BME26

3.6.1 Estímulo com microorganismos inativados por calor e lipopolisacarídeo (LPS)

Suspensões das bactérias *Micrococcus luteus* (10^4 bactérias/mL) ou *Enterobacter cloacae* (10^8 bactérias/mL) em tampão fosfato-salino (PBS2: Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 1,8 mM; pH 7,4; NaCl 0,14 M; KCl_2 7 mM) foram incubadas em um banho úmido a uma temperatura de 60 °C por 30 min. Após esse tratamento, para confirmar que as bactérias haviam sido inativadas, as culturas foram semeadas em meio Lúria-Bertani (LB) contendo ágar 1,5% (m/v) e incubadas a 37 °C por 16 h. Foram utilizadas também leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (10^7 leveduras/mL) inativadas por calor através do tratamento em autoclave por 15 min a uma temperatura de 120 °C. Foi utilizada nos experimentos uma MOI de 100 microorganismos por célula BME26. Nos experimentos com LPS (*Escherichia coli*, sorotipo O:55 B:5, Sigma) foi utilizada uma concentração de 10 µg/mL, preparado em meio de cultura. As células BME26 foram mantidas em BOD (Fanem) a 34 °C e a expressão gênica dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) foi avaliada após 6 e 24 h do início da exposição aos estímulos. Como controle foram utilizadas células não expostas aos estímulos microbianos (tempo 0 h).

3.6.2 Infecção com *Anaplasma marginale*

Células provenientes de uma cultura de BME26, com aproximadamente 20% de infecção com *A. marginale*, foram rompidas com NL_2 e alíquotas de 180 µL foram inoculadas em tubos contendo células BME26. As células foram mantidas em BOD (Fanem) a 34 °C e a expressão gênica dos AMPs foi avaliada 6, 24 e 72 h após a infecção. Como controle foram utilizadas células não infectadas (tempo 0h).

3.7 Extração de RNA e DNA

As células BME26 foram homogeneizadas com o auxílio de pistilos estéreis acoplados a um homogeneizador Pellet Pestle (Sigma), na presença de 1 mL do reagente Trizol[®] (Invitrogen). O RNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante e o produto obtido foi tratado com DNase (Promega), também segundo as orientações do fabricante. Ao final do tratamento, o RNA foi ressuspense em 30 µL de tampão Tris 10mM/EDTA 1mM (TE) e armazenado a -80 °C até a sua utilização. O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo do reagente Trizol[®] (Invitrogen), sendo que o produto obtido foi ressuspense em 90 µL de água ultrapura contendo dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v), 10 µL de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 200 µL de etanol 100%. Essa mistura foi incubada por 1 h a -80°C e em seguida centrifugada a 16.000 x g, por 10min a 4 °C. O sedimento foi submetido a uma lavagem com etanol 80% por centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. O sedimento foi concentrado em centrífuga a vácuo (Thermo Savant, EUA) e ressuspense em 30 µL de tampão TE e incubado a 4 °C, por 12 h. Após esse período o DNA foi armazenado a -80 °C até a sua utilização.

3.8 Síntese de cDNA

Foi utilizado para a síntese do cDNA 100 ng do RNA total extraído como descrito no **item 3.7**, acrescidos de 1 µL de oligo dT anchor (10 µM) descrito na **Tabela 1 (item 3.2)**. A mistura foi aquecida a 42 °C por 10 min e em seguida resfriada em gelo por 1 min, acrescentou-se à mistura 4 µL do tampão para a enzima Superscript III[™] (Invitrogen) concentrado 5 x, 2,5 µL de ditioneitol (DTT) 40 mM, 1 µL de dNTP 4 mM, 2,5 µL de MgCl₂ 10 mM e 1 µL da enzima Superscript III[™] (200U) e incubados por 90 min a 50 °C. Ao término da reação, o volume foi elevado para 50 µL com água ultrapura contendo DEPC 0,1% (v/v) e o material armazenado a -20 °C até a sua utilização.

3.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As PCR foram preparadas com uma mistura de 2 µL de tampão para Taq DNA polimerase (Amersham Biosciences) concentrado 10x, 1 µL de dNTP 10 mM, 1 µL dos oligonucleotídeos senso e antisenso da Microplusina, Defensina, Ixodidina, CV e MSP4 (10 µM) descritos na **Tabela 1**, 2 µL da enzima Taq DNA polimerase (5U/µL), 2 µL de cDNA e 11 µL de água ultrapura. As reações foram realizadas em um termociclador Mastercycler® (Eppendorf, EUA) com os programas térmicos descritos na **Tabela 1**. Os produtos da amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) com uma voltagem constante de 100 V. Para visualização das bandas dos produtos de PCR, o gel foi incubado em uma solução de brometo de etídeo (0,5 µLg/mL) em tampão Tris-borato 45 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM, pH 8 (TBE) por 10 min e analisado sob luz ultravioleta em um transiluminador ImageQuant™ 300 (GE Healthcare, EUA).

3.10 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

As qPCR foram realizadas com uma mistura contendo 8 µL do Kit *Quantimix Easy SYG* (Biotools, Espanha), 1 µL de cada um dos oligonucleotídeos MicRT, DefRT, IxoRT e RibRT senso e antisenso (**Tabela 1**), 4 µL de água ultrapura e 2 µL de cDNA. Foi utilizado para as reações um termociclador Mastercycler® ep realplex2 (Eppendorf) e o programa térmico descrito na **Tabela 1**. A quantidade do cDNA das amostras foi normalizada de acordo com os níveis de expressão do gene endógeno da proteína ribossomal S3A. A relação entre a expressão do gene de interesse nas células infectadas e na condição controle (células não infectadas, tempo 0 h) foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, conforme proposto por (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Para o tratamento estatístico foi utilizado o teste *T-student* ajustando-se os parâmetros para análise unicaudal e variância desigual de três amostras. Nas reações foram realizadas três réplicas técnicas de cada amostra.

3.11 Análise do DNA

3.11.1 Extração e purificação do DNA do gel de agarose

O DNA correspondente ao produto amplificado através da PCR foi recortado do gel de agarose e purificado através do Kit Concert™ Rapid PCR Purification System (Gibco/BRL, EUA), utilizando-se o protocolo de extração por centrifugação, segundo as instruções do fabricante.

3.11.2 Ligação no vetor pGEM® T e transformação das bactérias *Escherichia coli* DH5α

Após a purificação, o DNA foi ligado ao vetor pGEM® T Easy Vector Systems (Promega, PA, EUA), segundo as instruções do fabricante. Para a transformação, o produto de ligação foi incubado com uma cultura de bactérias *Escherichia coli* DH5-α em gelo por 25 min e submetido a um choque térmico por 2 min a 42 °C, seguidos de 2 min a 0 °C. Após esse tratamento, foi adicionado à suspensão bacteriana 100 µL de meio LB (Invitrogen) e a mistura foi submetida a uma incubação por 1 h a 37 °C. Em seguida, 100 µL da suspensão foram semeados em meio de cultura LB com ágar 1,5% (m/v) contendo 4 µL de isopropiltio-β-galactosídeo (IPTG) 1M, 40 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo (XGal) 20 mg/mL e 1 µL de ampicilina (100 mg/mL). As culturas foram incubadas a 37 °C por 18 h, sob agitação contínua (New Brunswick Scientific, USA).

3.11.3 Purificação dos plasmídeos

As colônias transformadas foram transferidas para tubos de polipropileno contendo 3 mL de meio LB e ampicilina (100 mg/mL) e incubadas por aproximadamente 18 h a 37 °C, sob agitação. Após a incubação, 1 mL da cultura foi submetido à purificação dos plasmídeos utilizando-se o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

3.11.4 Sequenciamento

O DNA purificado a partir plasmídeos foi amplificado por PCR, utilizando-se o kit ABI Prism® dGTP Big Dye™ Terminator Ready Reaction Kit with AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems, EUA), conforme as especificações do fabricante, com os oligonucleotídeos M13 senso e antisenso (10µM) e o programa térmico descrito na **Tabela 1**. Os produtos da PCR foram precipitados com isopropanol 75%, incubados por 15 min à temperatura ambiente e em seguida centrifugados a 12 000 x g por 20 min a 4 °C. O precipitado resultante foi lavado com isopropanol 75% e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sedimento foi concentrado em centrífuga a vácuo (ThermoSavant) ressuspensão em 20 µL de *template suppression reaction* (TSR) (Applied Biosystems) e submetido ao seqüenciamento em um sequenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

3.12 Construção das Bibliotecas

3.12.1 Produção de etiquetas de seqüências transcritas (ESTs)

A biblioteca foi construída a partir de 600 µg de RNA extraído das células BME26 como descrito no **item 3.7**. O RNA contido nos tubos foi precipitado em acetato de sódio 3 M em etanol. Em seguida os tubos foram incubados por 30 min a -20 °C, ao final da incubação foram submetidos à centrifugação de 12 000 x g, por 15 min a 4 °C. O RNA mensageiro foi purificado a partir do RNA total utilizando-se o kit PolyAtract mRNA Isolation System III (Promega) e a biblioteca preparada utilizando-se o kit CloneMiner™ cDNA Library Construction™ (Invitrogen). O sequenciamento foi realizado como descrito no **item 3.11.4** em um sequenciador automático de DNA ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems). As seqüências foram processadas de acordo com a metodologia descrita por Lorenzini e colaboradores (LORENZINI *et al.*, 2006).

Para cada seqüência montada das *ESTs* foi realizada uma busca por seqüências semelhantes com o algoritmo BlastX (ALTSCHUL *et al.*, 1997). As buscas com esse algoritmo foram realizadas no banco de seqüências do UNIPROT(TrEMBL + Swiss-Prot, www.uniprot.org), sendo utilizado como critério de validação das buscas, as seqüências encontradas com índice de significância (*e-value*) inferior a $1e10^{-6}$. As seqüências montadas com similaridades nos bancos públicos foram analisadas individualmente para a atribuição de uma função molecular e um processo biológico, utilizando-se o sistema de nomenclatura de genes *Gene Ontology* (GO) (www.geneontology.org) (ASHBURNER *et al.*, 2000). As seqüências anotadas foram armazenadas na página <<http://143.107.122.6/tick/>> criada pelo Dr. Daniel Macedo Lorenzini.

3.12.2 Bibliotecas Subtrativas

As células BME26 foram infectadas com *A. marginale* como descrito no **item 3.6.2** e coletadas em 3, 7 e 14 dias após a infecção. Sendo que as bibliotecas subtrativas foram construídas a partir de culturas de células BME26 não infectadas e infectadas com sete dias após a infecção. Foram utilizados 2 µg do RNA extraído como descrito no **item 3.7** para a síntese de cDNA, utilizando-se para isso o Kit Super Smart™ PCR cDNA Synthesis (Clontech, EUA) de acordo com as instruções

do fabricante. Para a confecção das bibliotecas foi utilizada a metodologia descrita por (DIATCHENKO *et al.*, 1996) e os reagentes e orientações do kit PCR™ Select cDNA Subtraction Kit (Clontech), sendo utilizado como controle o cDNA de placenta humana. Os produtos obtidos nas reações de PCR, foram ligados ao vetor pGEM® T Easy Vector Systems (Promega) e transformados nas bactérias *E. coli* como descrito no **item 3.11.2**. As colônias transformadas foram transferidas para placas com 96 poços contendo 1,5 mL de meio LB e ampicilina (50 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 24 h, com agitação contínua de 300 rpm (New Brunswick Scientific). Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 1000 x g, por 30 min e os plasmídeos purificados utilizando-se o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo-se as instruções do fabricante. Os plasmídeos foram seqüenciados utilizando-se o oligonucleotídeo M13 (10µM) senso (**Tabela 1**). As sequências obtidas foram processadas de acordo com a metodologia descrita por Lorenzini e colaboradores (LORENZINI *et al.*, 2006)

3.13 Silenciamento gênico dos AMPs através de RNA de interferência (RNAi)

3.13.1 Produção das duplas fitas de RNA (dsRNA)

O RNA das células BME26 foi utilizado como molde nas reações de transcrição reversa seguida por reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) com o kit *Acess RT-PCR Core Reagents* (Promega) e os oligonucleotídeos dsMic, dsDef, dsIxo e dsSub (10 µM) (**Tabela 2**). As reações foram realizadas em um termociclador Bio-Rad iQ5™ (Bio-Rad, EUA) com o programa térmico descrito na **Tabela 2**. Os produtos amplificados na RT-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose como descrito no **item 3.9** e purificados utilizando-se o Kit *PureLink PCR Purification* (Invitrogen) de acordo com as orientações do fabricante. Como controle para os experimentos de silenciamento gênico foi utilizado um gene não relacionado que codifica a proteína de superfície MSP1 de *Plasmodium falciparum* (número de acesso AF061132). O gene dessa proteína foi inserido em

um vetor TOPO™ (Invitrogen), que nos foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gerhard Wunderlich do Depto de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo. A produção das dsRNA foi realizada com os reagentes e as orientações fornecidas pelo Kit MEGAscript® RNAi (Ambion, EUA), utilizando os produtos de RT-PCR, assim como o plasmídeo contendo MSP1.

3.13.2 Tratamento das células BME26 com dsRNA dos AMPs e infecção com *Anaplasma marginale*

As células BME26 foram transferidas para os tubos de cultivo 24 h antes da adição das dsRNA. Após esse período, o meio foi trocado para 490 µL do meio de cultivo descrito no **item 3.5** e 10 µL de dsRNA (10^{11} moléculas/µl) dos AMPs, ou da subolesina (controle positivo) (ALMAZAN *et al.*, 2003) ou da MSP1 (gene não relacionado) ou 10 µl de tampão de eluição (MEGAscript® RNAi, Ambion, EUA), seguido de incubação em BOD (Fanem) a 34 °C por 24 h. Findo este período, as células foram infectadas com *A. marginale* como descrito no **item 3.6.2** e mantidas em estufa a 34 °C por 72 h. Após esse período as células BME26 foram submetidas à extração de RNA e DNA genômico como descrito no **item 3.7**. Foram realizadas quatro réplicas biológicas para cada tratamento.

3.13.3 Avaliação do silenciamento gênico das células BME26 tratadas com dsRNA dos AMPs

O silenciamento gênico dos AMPs foi avaliado através de qPCR como descrito no **item 3.10**, utilizando-se como molde o cDNA das células tratadas com dsRNA (genes alvo e controles) preparado como descrito no **item 3.8**. Foram utilizados nas reações os oligonucleotídeos MicRT, DefRT, IxoRT e SubRT (10 µM) e os programas térmicos descritos na **Tabela 1**.

3.13.4 Quantificação das riquetsias em células tratadas com dsRNA e infectadas com *Anaplasma marginale*

A quantificação das riquetsias foi determinada através da relação entre o número de moléculas presentes nas células tratadas com dsRNA e o número de riquetsias nas células-controle (positivo e negativo). O número de cópias da MSP4 foi determinado utilizando-se uma curva padrão previamente construída com diferentes diluições (1 ng à 10^{-8} ng) do produto de expressão da MSP4 de *A. marginale*. As quantificações das riquetsias bem como a curva padrão foram obtidas através de qPCR com oligonucleotídeos MSP4 (10 μ M) senso e antisenso (**Tabela 1**) e utilizando-se como molde o DNA de células infectadas com *A. marginale*.

3.14 Avaliação da expressão do gene codificador da proteína de capsídeo viral em células BME26

A expressão do gene que codifica a proteína de capsídeo do vírus, foi quantificada por qPCR. O cDNA de células BME26 com 3, 7 e 14 dias após a infecção com *A. marginale* foi utilizado como molde nas reações, com os oligonucleotídeos CV (10 μ M) senso e antisenso e o programa térmico descrito (**Tabela 1**).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das células embrionárias BME26

4.1.1 Origem das células BME26

A cultura de células embrionárias BME26 foi estabelecida pelo Dr Kurtti e utilizada para padronização de meios de cultura para células de carrapatos (MUNDERLOH e KURTTI, 1989) e para estudos de infecção do patógeno *Borrelia burgdorferi* (KURTTI *et al.*, 1993). Nosso grupo de pesquisa recebeu essa cultura de células em meados de 2003 e passou a utilizá-la como modelo para o presente estudo. Primeiramente, foram realizados experimentos para confirmar a origem das células BME26. A comparação da sequência de nucleotídeos de um fragmento da subunidade 16S do rRNA mitocondrial obtida a partir do DNA genômico das células BME26 mostrou 100% de identidade com a sequência pertencente ao carrapato *R. (B.) microplus* (**Figura 1**). Além disso, mostrou um percentual de identidade entre 76 a 97% com as sequências de outras espécies de carrapatos pertencentes à família Ixodidae (**Tabela 3**).

RBm	TCAATGATTTTTTAAATTGCTGTAGTATTTTGACTATACAAAGGTATTGAAATAAGATTTTAATTGAATGCTAAGAGAAT	- 80
BME26		
RBm	GGAATATCAAAAAACAACCTTCTTAAATTTAAATTTGAAATTTTTTAATTTGTGTAAAAACAATTATAARAATTAAAG	- 160
BME26		
RBm	ACAAGAAGACCCTAAGAATTTTAAATTTAAATAATACATTTTTTGTTTTAATTAAATTTTAACTGGGGCGGTAAAAA	- 240
BME26		
RBm	ATATTAAAACTTTTAAATTTAAATGACCCATTATTAATGAAAATATGATTAAATACTCTAGGGATAACAGCGTTATA	- 320
BME26		
RBm	TTTTTGTATAGATCATATTGACAAAAAGTTGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACTTTTTTAATGAAGATATTAAAA	- 380
BME26		
RBm	TAAGAAGTTTGTCAACTTTTAAATTCCTACTTGATCTGAGTTCAGACCGG	- 431
BME26		

Figura 1 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos do fragmento da subunidade 16S do rRNA mitocondrial. Comparação entre a sequência do fragmento da subunidade 16S do rRNA mitocondrial obtido a partir da cultura de células embrionárias (BME26) com a sequência *R. (B.) microplus* (RBm) depositada no GenBank (código de acesso: L34310). Os pontos representam nucleotídeos idênticos entre as sequências.

Tabela 3 - Comparação da sequência do fragmento da subunidade 16S do rRNA mitocondrial da cultura de células BME26 com as sequências de outras espécies de carrapatos pertencentes à família Ixodidae.

Espécie	Código de acesso (<i>GenBank</i>)	% de Identidade
<i>Boophilus microplus</i>	L34310	100%
<i>Boophilus annulatus</i>	Z97877	97%
<i>Rhipicephalus bursa</i>	Z97878	91%
<i>Dermacentor andersoni</i>	L34300	84%
<i>Haemaphysalis cretica</i>	L34308	80%
<i>Amblyomma hebraeum</i>	L34316	77%
<i>Ixodes ricinus</i>	Z97882	76%

4.1.2 Caracterização morfológica das células BME26

As células BME26 têm um crescimento bastante lento, de acordo com a cinética de crescimento estabelecida em nosso laboratório, na qual observamos que o número de células duplica a cada quinze dias (resultados não mostrados). Realizamos a caracterização morfológica das células BME26 através de microscopia óptica e eletrônica. Observamos que as células BME26, nos primeiros dias após a subcultura, apresentam um formato alongado, com prolongamentos lembrando fibroblastos (**Figura 2A**, setas brancas). Porém ao longo do tempo de cultivo, as células tornam-se arredondadas, com o núcleo ocupando uma grande área da célula (**Figura 2A**, cabeça de seta) e o citoplasma densamente preenchido por vesículas (**Figura 2A**, seta vermelha). Apesar das diferenças morfológicas observadas nos primeiros dias após a subcultura, verificamos que quando a monocamada de células atinge a confluência, predominam as células com formato mais arredondado e com citoplasma preenchido por vesículas. Com a marcação fluorescente por rodamina 123, verificamos uma grande quantidade de mitocôndrias, presentes no citoplasma, indicando que as células possuem um alto metabolismo respiratório (**Figura 2E**, setas brancas). Os resultados obtidos com a marcação com laranja de acridina mostraram que as vesículas presentes no citoplasma apresentam diferentes graus de acidificação (**Figura 2H**, setas brancas) e seu conteúdo é de natureza lipídica,

que foi evidenciado pela marcação fluorescente por vermelho do nilo observada no interior dessas estruturas (**Figura 3B**). Outra evidência do conteúdo lipídico dessas estruturas foi obtido quando as células BME26 foram incubadas com paládio-mesoporfirina IX (Pd-mP). Esse marcador emite fluorescência vermelha ou verde, quando está associado com proteínas ou lipídios, respectivamente. Detectamos a emissão da fluorescência verde nas vesículas presentes no citoplasma, indicando a associação do marcador com moléculas lipídicas e uma marcação em vermelho difusa no citoplasma (**Figura 3D**).

Figura 2 - Caracterização morfológica das células BME26.

A, D e G: Contraste de interferência diferencial (DIC), **B, E e H:** Microscopia de fluorescência, **C, F e I:** Imagens sobrepostas. **A-C:** Coloração com DAPI, células com aparência de fibroblatos (**A, setas brancas**), células com citoplasma preenchidos por vesículas (**A, seta vermelha**) e células com o núcleo ocupando grande parte do citoplasma (**A, cabeça de seta**). **D-F:** Coloração com rodamina 123, mitocôndrias (**E, setas brancas**). **G-I:** Coloração com laranja de acridina, destacando os diferentes graus de acidificação no interior das vesículas do citoplasma (**H, setas brancas**). **Barra de escala: 20 μ m.**

Figura 3 - Caracterização do conteúdo das vesículas das células BME26.

A e C: DIC, **B e D:** Microscopia de fluorescência. **A e B:** Coloração com vermelho do Nilo, mostrando conteúdo lipídico das vesículas grandes (**B, setas brancas**). **C e D:** incorporação do Pd-mP, mostrando a emissão fluorescência verde, no interior das vesículas (**D, setas brancas**). **Barra de escala: 20 μ m.**

No material obtido através da microscopia eletrônica observamos também a presença das vesículas de tamanho variado preenchendo praticamente todo o citoplasma das células BME26 (**Figura 4A**, asteriscos). No interior dessas vesículas detectamos a presença de estruturas membranosas, (**Figura 4B**, seta e cabeça de seta) e material heterogêneo (**Figura 4B**, asterisco branco), provavelmente resultado da autofagia. Observamos também a presença de uma grande quantidade de glicogênio no citoplasma das células (**Figura 4B**, asterisco negro).

Detectamos vesículas pequenas presentes no citoplasma contendo hemoglobina marcada com rodamina (**Figura 5C**, setas negras), mostrando que a

hemoglobina foi endocitada pelas células em cultura. Em seguida investigamos se as células possuem receptor específico para a hemoglobina, como havia sido observado nas células digestivas do carrapato *R. (B). microplus* (LARA *et al.*, 2005). Para isso, as células BME26 foram incubadas por 24 h com hemoglobina não marcada com rodamina e marcada em uma relação 100:1 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$). Ao final da incubação detectamos uma marcação relativamente forte da fluorescência da hemoglobina dentro das vesículas presentes no citoplasma (**Figura 5F**, setas negras), sugerindo que não há um receptor específico para esta proteína em células BME26.

Figura 4 - Caracterização das células BME26 por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A: Vesículas no citoplasma (asteriscos) Nu: núcleo. **B:** Vesículas em maior aumento, mostrando membranas (seta branca e cabeça de seta) e material heterogêneo (asterisco branco), glicogênio (asterisco negro). Barra de escala: 1 μm .

Figura 5 - Endocitose da hemoglobina pelas células BME26. A e D: DIC, B e E: microscopia de fluorescência, C e F: imagens sobrepostas. A-C: Células BME26 incubadas com hemoglobina marcada com rodamina, fluorescência nas vesículas pequenas presentes no citoplasma (C, **setas negras**), **D-F:** Células BME26 incubadas com hemoglobina marcada e não marcada com rodamina, marcação fluorescente presente nas vesículas pequenas no citoplasma (F, **setas negras**). **Barra de escala: 20 μ m.**

4.1.3 Caracterização da função de defesa das células BME26

Devido ao interesse do nosso grupo de pesquisa no estudo do sistema imune do carrapato *R. (B.) microplus*, investigamos se as células BME26 desempenhavam atividades características de células com função de defesa. O sequenciamento dos produtos da PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene dos três AMPs caracterizados por nosso grupo: a microplusina (Fogaca et al., 2004, Esteves et al., 2009), a defensina (FOGACA et al., 2004) e a ixodidina (FOGACA et al., 2006) amplificados a partir do cDNA das células BME26, mostrou que as células BME26 expressam constitutivamente esses três AMPs (resultados não mostrados). Através de imunofluorescência utilizando o antisoro anti-microplusina (ESTEVES et al.,

2009), detectamos uma marcação no citoplasma das células BME26. A fluorescência mostrou que o peptídeo se encontra em compartimentos celulares (**Figura 6B**), nas organelas do complexo de Golgi ou no retículo endoplasmático (**Figura 6B**, detalhe). As células incubadas com soro pré-imune não mostraram marcação (**Figura 6-D**).

Figura 6 - Imunolocalização da microplusina nas células BME26.

A e C: Contraste de Fase, **B e D:** Imunofluorescência. **B:** As células BME26 foram submetidas à reação de imunofluorescência com o anticorpo anti-microplusina e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com rodamina (vermelho), ambos diluídos 200 vezes. Célula evidenciando organelas de secreção (vermelho) (**B: detalhe**). Núcleo marcado com DAPI (azul). **D:** Controle Negativo da reação de imunofluorescência, núcleo marcado com DAPI (azul). **Barra de escala: 10 μm.**

Além da expressão gênica constitutiva dos AMPs, verificamos que as células BME26 desempenham outra função relacionada com o sistema imune, a fagocitose. As células foram incubadas por 24 h com leveduras (*S. cerevisiae*) previamente marcadas com cytotracker, sendo que a fluorescência foi detectada no interior das células (**Figura 7A**, setas negras), mostrando a atividade fagocítica das mesmas. Essa atividade também foi confirmada através de microscopia eletrônica (**Figura 7B**, setas negras).

Figura 7 - Fagocitose das células BME26 incubadas com *Saccharomyces cerevisiae*.

A: Imagens sobrepostas de microscopia de fluorescência e DIC: leveduras marcadas com cytotracker fagocitadas no citoplasma (setas negras). **B:** Eletromicrografia de células embrionárias BME26 incubadas com leveduras (*S. cerevisiae*). **NU:** Núcleo. **Barra de escala: 1 µm.**

4.1.4 Caracterização molecular das células BME26

Na busca de outros genes relacionados ao sistema imune, foi construída uma biblioteca de etiquetas de sequências transcritas (*ESTs*) a partir do cDNA das células BME26. Foram obtidos 5088 clones, sendo 1475 sequências consideradas de alta qualidade, obtendo-se após análise, 895 seqüências montadas (SM). Desse total, 556 sequências não apresentaram semelhanças na busca realizada em bancos de dados públicos, restando, portanto, 340 SMs. Essas SMs foram anotadas manualmente, através do sistema de nomenclatura de genes *Gene Ontology* (GO). A análise das sequências revelou diversos transcritos relacionados a diferentes classes funcionais (**Figura 8**). As sequências identificadas na anotação manual

elacionadas com o sistema imune foram re-analisadas, utilizando-se bancos contendo sequências de componentes do sistema imune de *Limulus* spp., de *Drosophila melanogaster* e da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*, estabelecidas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (LORENZINI *et al.*, 2006). Dentre essas sequências, identificamos os peptídeos antimicrobianos microplusina e hebraína, e também a ferritina, proteína *heat shock* (HSP 70 kDa), glutathione S-transferase, peroxidase e NADPH oxidase, entre outros, que estão apresentados na **Tabela 4**.

Figura 8 - Perfil de expressão gênica das células BME26. Transcritos obtidos na biblioteca de cDNA das células BME26, agrupados nas classes funcionais de acordo com a função molecular usando a nomenclatura do *Gene Ontology*. Os valores acima das barras indicam o número de sequências presentes em cada classe funcional.

Tabela 4 - Transcritos relacionados com sistema imune identificados na biblioteca de cDNA da células BME26.

Código da sequência (Biblioteca BME26)	Código de Acesso	Descrição	Espécie	e-value
BMJFCE1001D06	Q6WNX4_BOOMI	Ferritina	<i>Boophilus microplus</i>	1.0e-94
BMJFCE1002H03	Q8MVB7_IXOSC	α -macroglobulina 2	<i>Ixodes scapularis</i>	5.0e-22
BMJFCE1001D02	Q86LE5_BOOMI	Microplusina	<i>B. microplus</i>	1.0e-27
	Q64K37_9ACAR	Hebraina	<i>Amblyomma hebraeum</i>	1.0e-20
BMJFCE1007B06	Q512A7_MYTGA	HSP 70 kDa	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	7.0e-82
BMJFCE1010G05	Q6JVM9_RHIAP	Glutathione S-transferase	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	1.0e-121
BMJFCE1018B10	Q7PTJO_ANOGA	Atividade de Peroxidase	<i>Anopheles gambiae</i>	3.0e-55
BMJFCE1004E12	Q9VQH2_DROME	NADPH oxidase	<i>Drosophila melanogaster</i>	6.0e-29
BMJFCE1006G02	Q81862_DERVA	Fator D-like	<i>Dermacentor variabilis</i>	5.0e-71
BMJFCE1012H01	Q9NFY2_ANOGA	Serino protease	<i>A. gambiae</i>	3.0e-31
BMJFCE1019E08	Q8WQXO_RHIAP	Inibidor de serino protease	<i>R. appendiculatus</i>	3.0e-48

4.2 Estabelecimento da infecção das células BME26 com *A. Marginale* (UFMG1)

Inicialmente, tivemos que estabelecer a infecção de *A. marginale* em células BME26, uma vez que na literatura não havia dados reportando esse sistema. As células BME26 infectadas com *A. marginale* foram monitoradas em intervalos de dois dias após a adição do inóculo inicial, sendo que somente com oito dias foram observadas no citoplasma as primeiras colônias jovens de *A. marginale* (**Figura 9A**, setas negras). Com aproximadamente quatorze dias após a infecção, observamos as primeiras colônias maduras, sendo que as colônias jovens continuaram a ser

detectadas nesse período. Observamos também células contendo mais de um vacúolo com riquetsias no citoplasma (**Figura 9B**, setas negras). Aproximadamente 20 dias após o início da infecção, além dos vacúolos largamente preenchidos com riquetsias (**Figura 9C**, setas negras), detectamos riquetsias extracelularmente, (**Figura 9D**, setas negras). Nesta fase detectamos um percentual de infecção em torno de 30%. Já num período tardio, aproximadamente 25 dias após a adição das riquetsias, observamos que muitas células estavam desprendidas do frasco de cultivo, provavelmente em razão do efeito citopáticoproduzido pela infecção. Confirmamos ainda a infecção da *A. marginale* nas células BME26 através do sequenciamento de um fragmento da subunidade 16S do rRNA da *A. marginale* (código de acesso. AF309866) amplificado por PCR (resultados não mostrados).

Figura 9 - Células BME26 infectadas com *Anaplasma marginale* (UFMG1). A: Coloração com Panóptico de célula com 8 dias pós-infecção, mostrando a presença de colônias jovens (**seta negra**). B: Coloração com Panóptico de células com 14 dias pós-infecção, colônia madura (**seta negra**). C: Coloração com Panóptico de células com 20 dias pós-infecção, com colônias maduras contendo muitas riquetsias em seu interior (**setas negras**). D: Riquetsias no meio extracelular coradas com Panóptico, com 20 dias pós-infecção (**setas negras**). Barra de escala: 10 μ m.

4.3 Avaliação da expressão gênica dos AMPs em células BME26 frente a diferentes desafios microbianos

A expressão gênica dos AMPs foi avaliada por qPCR em 6, 24 e 72 h pós-infecção por *A. marginale* nas células BME26 (**Figura 10**). Verificamos que a expressão dos genes da defensina e da ixodidina foi significativamente aumentada em relação a sua expressão em células não infectadas em todos os tempos analisados. Já o gene da microplusina não mostrou nenhuma alteração na sua expressão em relação às células não infectadas (controle) (**Figura 10**).

Figura 10 - Perfil de expressão gênica dos AMPs em células BME26 infectadas com *Anaplasma marginale*.

As células BME26 foram infectadas com *A. marginale* e a expressão gênica dos AMPs foi determinada por qPCR, considerando a expressão nas células não infectadas como controle (0 h). A quantidade de cDNA das amostras foi normalizada em relação ao gene da proteína ribossomal S3A.

* $p \leq 0,05$, Número de réplicas biológicas = 4.

Quando as células BME26 foram expostas ao estímulo com bactérias *E. cloacae* inativadas por calor, observamos que a expressão gênica dos três AMPs foi aumentada com 6 h após a exposição, havendo uma diminuição significativa também da expressão de todos os genes com 24 h após o estímulo em relação à expressão nas células não expostas (**Figura 11**). Verificamos que, quando as células BME26 foram incubadas com LPS, somente a expressão gênica da microplusina foi aumentada em 6 h após a exposição. Para os outros AMPs, o aumento da expressão foi significativo somente com 24 h após a exposição em relação às células que não foram expostas a esse estímulo (**Figura 12**).

Figura 11 - Perfil de expressão gênica dos AMPs em células BME26 estimuladas com bactérias *Enterobacter cloacae* inativadas por calor. As células BME26 foram estimuladas com *E. cloacae* em uma MOI de 100:1 e a expressão gênica dos AMPs foi determinada por qPCR, considerando a expressão nas células não estimuladas como controle. A quantidade de cDNA das amostras foi normalizada em relação à expressão do gene da proteína ribossomal S3A.

* $p \leq 0,05$, Número de réplicas biológicas = 4

Figura 12 - Perfil de expressão gênica dos AMPs em células BME26 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). As células BME26 foram expostas a LPS (10 µg/ml) e a expressão gênica dos AMPs foi avaliada por qPCR, considerando a expressão nas células não estimuladas como controle. A quantidade de cDNA das amostras foi normalizada em relação ao gene da proteína ribossomal S3A. * $p \leq 0,05$, Número de réplicas biológicas = 4.

No estímulo das células BME26 com as bactérias Gram-positiva *M. luteus* inativadas por calor, verificamos que somente a expressão gênica da microplusina foi aumentada com 24 h após a exposição ao estímulo (**Figura 13**). Já quando as células BME26 foram incubadas com a levedura *S. cerevisiae*, a expressão gênica da microplusina e também da defensina foi aumentada significativamente com 6 h após a exposição ao estímulo em relação às células não expostas, além disso, a expressão da microplusina continuou aumentada em 24 h após a exposição (**Figura 14**). Por outro lado a expressão gênica da ixodidina foi significativamente reprimida com este estímulo.

Figura 13 - Perfil de expressão gênica dos AMPs em células BME26 estimuladas com bactérias *Micrococcus luteus* inativadas por calor. As células BME26 foram expostas ao estímulo com *M. luteus* em uma MOI de 100:1 e a expressão gênica dos AMPs foi determinada por qPCR, considerando a expressão nas células não estimuladas como controle. A quantidade de cDNA das amostras foi normalizada em relação ao gene da proteína ribossomal S3A.
* $p \leq 0,05$, Número de réplicas biológicas = 4.

Figura 14 - Perfil de expressão gênica dos AMPs, em células BME26 estimuladas com bactérias *Saccharomyces cerevisiae* inativadas por calor. As células BME26 foram expostas ao estímulo com *S. cerevisiae* em uma MOI de 100:1 e a expressão gênica dos AMPs foi determinada por qPCR, considerando a expressão nas células não estimuladas como controle. A quantidade de cDNA das amostras foi normalizada em relação ao gene da proteína ribossomal S3A.
* $p \leq 0,05$, Número de réplicas biológicas = 4.

4.4 Silenciamento dos genes que codificam os AMPs e a infecção das células BME26 por *A. marginale*

As células BME26 foram tratadas com a dsRNA dos AMPs e o efeito do tratamento foi avaliado após 72 h . Observamos que o nível de transcrição do gene da microplusina foi reduzido em $86,99 \pm 7\%$, com o tratamento com dsRNA, em relação as células tratadas com a dsRNA do gene da MSP1 de *P. falciparum* (controle negativo, gene não relacionado) ou em relação as células que receberam somente tampão de eluição (controle negativo) (**Tabela 5**). No tratamento das células BME26 com a dsRNA da defensina, detectamos uma redução na expressão gênica de $97,14 \pm 0,57\%$ em relação às células que foram tratadas com tampão de eluição (**Tabela 5**). Já no tratamento das células com a dsRNA da ixodidina, não detectamos redução dos transcritos. Utilizamos também nos ensaios de silenciamento um controle positivo, que foi o tratamento com a dsRNA do gene da subolesina (ALMAZAN *et al.*, 2003), obtendo um efeito na redução dos seus transcritos de $89,46 \pm 3,12\%$ (**Tabela 5**). Em seguida, avaliamos a infecção pelas riquetsias através da quantificação do número de moléculas de uma proteína de superfície de *A. marginale*, a MSP4, que é codificada por um gene copia única nas células cujos genes da microplusina e defensina haviam sido silenciados (**Tabela 5**). Como o gene codificador da MSP4 é de cópia única, pudemos assim determinar o número de riquetsias nessas células. Verificamos que o número riquetsias nas células com o gene da microplusina silenciado não é alterado em relação às células tratadas com dsRNA da MSP1 (gene não relacionado) ou ainda nas células que receberam apenas tampão. No tratamento das células BME26 com dsRNA da defensina (**Tabela 5**), também verificamos que não houve alteração do número de riquetsias nas células com o gene da defensina silenciado em relação às células que receberam apenas tampão.

Tabela 5 - Tratamento das células BME26 com dsRNA da microplusina e defensina e quantificação da MSP4 de *Anaplasma marginale*.

Gene	Silenciamento $\pm$ SE(%)	Número de moléculas de MSP4 ($\pm$ SE)	P
Microplusina	86,99 $\pm$ 7,0	4,16E+04($\pm$ 2,78E+04)	0,19
Microplusina/Controle (tampão)	-	1,04E+04($\pm$ 7,81E+03)	-
Microplusina/Gene não relacionado (MSP1)	-	4,19E+03($\pm$ 2,10E+03)	-
Defensina	97,14 $\pm$ 0,57	1,36E+02($\pm$ 3,46E+01)	0,15
Defensina/Controle (tampão)	-	1,79E+02($\pm$ 2,58E+0)	
Subolesina	89,46 $\pm$ 3,12	7,8E+04($\pm$ 7,66E04)	0,10

4.5 Expressão diferencial dos genes das células BME26 após infecção com *A. marginale*

Com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos em células BME26 infectadas com *A. marginale*, foram confeccionadas bibliotecas subtrativas de cDNA. Foram sequenciados 178 clones dos genes diferencialmente expressos nas células BME26 infectadas, sendo considerados 130 de alta qualidade. Nas análises realizadas nessas, identificamos que 83% apresentaram alta similaridade com poliproteína associada à replicação e com proteína de capsídeo de vários vírus. Em virtude da presença das seqüências virais na biblioteca de genes diferencialmente expressos nas células infectadas por *A. marginale*, não prosseguimos com o sequenciamento dos clones, pois não seria possível afirmar se a modulação na expressão dos genes seria consequência da infecção por *A. marginale* ou viral. Com o alinhamento das seqüências virais foram obtidos dois contíguos que foram denominados pelos números 66 (2 749 nucleotídeos) e 73 (542 nucleotídeos), formados por 36 e 72 *ESTs* respectivamente (**Figura 15**). As seqüências consenso desses contíguos foram comparadas com seqüências depositadas no *GenBank* utilizando a ferramenta blastP. O contíguo 66 mostrou

similaridade com poliproteína associada à replicação de várias espécies de vírus, enquanto o contíguo 73 apresentou similaridade com proteína de capsídeo (**Tabela 6**).

Contíguo 66

```
V R G L I S N M K N L Y D G V L L S T D S T N L H E R M L T L
D R C V D V A P T R S V S L I H L A G A P G C G K T A P L A E
A L R E L G W V N R T R V A V P T T T L R P A W R A H L R L Q
E T Q S Y R V S T W E T A L T K T A E I V V V D E V Y R M P N
G Y L D L L I M A D P N V R L V I L L G D P V Q A H Y H S T H
P S S T N N L L V P E H R Y L A P Y R D Y Y C A Y S Y R I P R
Q L C H Q L G L G A Y A E R E E M L I S S S A Q V N P K L P V
L V I S Q H I R A F T D F G Y R A I T W A S A Q G L D V D G P
V T L H I D R N V R L X S Q N X I L V A L T R S K T G V I F T
G D L S H L R Q S S G X L H A V L S R Q P F S Y V A A F S E Y
I G K S T V I T A P L P A R H V G G S P F A P P P T T A R N S
R F N P L S S F D V V A T P A I L H Q E X G G D N P D P Y H I
P L H F V P P S R L P L H S A X A P V C X Q D S I P T S A T L
D E L V P I T P C I P G E C F E T L A A T F M P A N D P E T R
E R V F R G E L T R Q F P Y L N R E F E L G P Q P L S L L A P
I H S P S T D P T X L P S S I D K R L R F R A S S A X Y T I T
S T D E F L G A R L F E A W S T L Q R L P A N V P F E P E L Y
A E C I N V N E Y A Q L T N K T K N V I A N N A D R S D P D W
R Y T W V R I F A K A Q H K V N A N S L F T D Y K A C Q T L A
L M H D Y V I L T L G P V K K Y Q R L L H A R Y R P D N I Y I
H A A H S P H K M S L Y C Q Q H L K S R M A L T N D Y T A F D
Q S Q H G E A V V F E R L K M E Q L N I P Q A L I D L H V F L
K T N V E T Q F G P L T C M R L T G E P G T Y D D N T D Y N L
A I L A L R Y I L T S A H T I F V S G D D S A I F P P P A S N
A H W H V V E N L I S L R F K I Q I D H H P L F C G Y Y I G P
A G A C R D P L A L F A K F A I A Y D A G E L H T K M A S Y V
A E F S I G H L L G D A V F Q L L P S S H V H F Y A A V F D L
I C R R A T V D Q K T I L N L H V A P E H R L V R F L K R A R
F F T Y T A A R I L Q A L T G S W F X T P T A S G D L P L E V
S V E G E L L R I G H D G T S P
```


Contíguo 73

G R G R G T A R I P A T P S L V A S P L S R D P S I K I P F Q
 F A L G T I G S Q D D K G I D Y V F A S I P Q F V K L V A P Y
 R R A R L C S L E A V L E P L V P L H D G Y S V I L C W T Q A
 N N V V V G A D A L A V P G A Q L F S V T S Y A V L A Q S Q I
 L P A P L H A L N P M V K D S V T Y T D S P R L H L S P F K L
 D D P G S A L L V L R G I L E V S S P A L V A N T

Figura 15 - Sequências deduzidas de aminoácidos dos contíguos 66 e 73 identificados na biblioteca de genes diferencialmente expressos nas células BME26 infectadas com *Anaplasma marginale*. As sequências de aminoácidos dos contíguos 73 e 66 foram deduzidas a partir da sequência de nucleotídeos obtidas pelo sequenciamento dos clones da biblioteca subtrativa de genes diferencialmente expressos nas células BME26 infectadas com *A. marginale*.

Tabela 6 - Comparação da sequência dos contíguos 66⁽¹⁾ e 73⁽²⁾ obtidos com o alinhamento das sequências virais identificadas na biblioteca de genes diferencialmente expressos nas células BME26 infectadas com *A. marginale* com sequências de outras espécies de vírus.

Código de acesso	Descrição	Espécie	Identidade (%)
ACV53023.1	Poliproteína ⁽¹⁾	<i>Blackberry virus S</i>	47%
AF265566.1	Poliproteína ⁽¹⁾	<i>Maize rayado fino virus</i>	47%
AAW88343.1	Poliproteína associada a replicação ⁽¹⁾	<i>Citrus sudden death-associated virus</i>	46%
ACV83739.1	Poliproteína associada a replicação ⁽¹⁾	<i>Grapevine virus Q</i>	43%
NP542613.1	Proteína de capsídeo ⁽²⁾	<i>Grapevine fleck virus</i>	37%
NP619757.1	Proteína de capsídeo ⁽²⁾	<i>Physalis mottle virus</i>	32%
ACI96295.1	Proteína de capsídeo ⁽²⁾	<i>Tomato yellow blotch virus</i>	31%
AAG59998.1	Proteína de capsídeo ⁽²⁾	<i>Petunia vein banding virus</i>	31%

Usando oligonucleotídeos desenhados a partir do gene da proteína de capsídeo viral, foi realizada uma análise quantitativa da sua expressão em células BME26 com 3, 7 e 14 dias após a infecção com *A. marginale*. Observamos que expressão do gene da proteína da capsídeo viral é significativamente aumentada em todos os tempos analisados em relação a células não infectadas (**Figura 16**). Em seguida investigamos se o vírus estaria presente nas células BME26 não infectadas por *A. marginale*. Através da PCR, utilizando o cDNA de células BME26 não infectadas e infectadas por *A. marginale*, foi obtido um produto de 200 pares de bases correspondente ao tamanho esperado, para ambas amostras (resultados não mostrados). O sequenciamento dos produtos amplificados mostrou 100% de

similaridade com o contíguo 73 evidenciando, portanto, que as células BME26 livres de infecção carregam esse vírus.

Figura 16 - Perfil de expressão gênica do capsídeo viral presente em células BME26 infectadas com *Anaplasma marginale*. As células BME26 foram infectadas com *A. marginale* e a expressão gênica do capsídeo viral foi determinada por qPCR, em 3, 7 e 14 dias após a infecção (**dpi**). A quantidade de cDNA das amostras foi normalizada em relação ao gene da proteína ribossomal S3A. **NI**: células não infectadas. **I**: células infectadas.
* $p \leq 0,05$, Número de réplicas biológicas = 4.

5 DISCUSSÃO

O carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o principal vetor no Brasil da riquetsia *Anaplasma marginale*. Nosso grupo de pesquisa, com enfoque no sistema imune desse carrapato, já isolou e caracterizou alguns peptídeos com ação antimicrobiana, bem como demonstrou a atividade fagocítica e a produção de espécies reativas de oxigênio pelos hemócitos desse Ixodídeo. Atualmente, estamos direcionando nossa atenção para o estudo da relação carrapato-patógeno. Em razão da preferência do carrapato pela alimentação sanguínea natural para o desenvolvimento dos nossos estudos seria necessário manter um animal infectado com um patógeno transmitido pelo carrapato. Porém, existem muitas dificuldades no manuseio de animais de grande porte infectados experimentalmente, exigindo a existência de um biotério exclusivo para a manutenção dos mesmos. Sendo assim, optamos por estabelecer e explorar um sistema *in vitro*, utilizando uma linhagem de células em cultura para o estudo da interface carrapato-patógeno.

Inicialmente confirmamos que as células embrionárias BME26 são originárias do carrapato *R. (B.) microplus*, através da comparação da sequência de nucleotídeos da subunidade 16S rRNA mitocondrial amplificada a partir das células BME26 com as sequências carrapatos pertencentes ao grupo Metastriata (MANGOLD *et al.*, 1998). A confirmação da identidade completa da sequência das células BME26 com *R. (B.) microplus* foi essencial para dar continuidade aos experimentos do nosso trabalho. Através da caracterização morfológica, foi possível observar que as células BME26 possuem inúmeras vesículas de tamanho variado no citoplasma, independentemente da idade da cultura. A caracterização do conteúdo das vesículas mostrou que essas estruturas fazem parte da via endocítica dessas células (**Figura 2G-I, Figuras 3 e 4**). Verificamos também a presença de hemoglobina captada pelas células no interior das vesículas menores, sugerindo que essas estruturas provavelmente sejam o destino final das proteínas endocitadas (**Figura 5A-C**). Identificamos na anotação funcional dos transcritos obtidos pela confecção de uma biblioteca de cDNA, uma sequência com similaridade com a GTPase Rab 11 (código de acesso BMJFCE1001C10), que é uma das proteínas que facilitam a ancoragem e fusão entre as membranas dos compartimentos

endocíticos, diretamente envolvida com endossomos de reciclagem (CLAGUE, 1998). A identificação desses transcritos fortalece a hipótese da presença de compartimentos envolvidos na via endocítica nas células BME26. Em um experimento de competição entre a hemoglobina marcada e a não marcada, realizado com as células BME26, verificamos que não há um receptor para hemoglobina, pois mesmo o excesso de proteína não marcada (100 x maior que a quantidade em massa da hemoglobina marcada) no meio de cultura, não foi suficiente para deslocar a hemoglobina marcada. Esse resultado difere do que foi observado nas células digestivas do carrapato *R. (B.) microplus* (LARA *et al.*, 2005), no qual foi verificado a presença de um receptor específico para hemoglobina.

Através de uma biblioteca de cDNA, identificamos muitos transcritos das células BME26 relacionados a diferentes classes funcionais, tais como atividade de estrutura molecular, moléculas ligadoras de ácido nucléico, moléculas ligadoras de ferro, moléculas com atividade de oxidoredutase e transferase. Nesta biblioteca foram identificados também vários transcritos relacionados ao sistema imune, sendo que dentre esses o mais abundante foi a ferritina, que conhecidamente desempenha funções de defesa e também está envolvida com o estoque e transporte de ferro em carrapatos e insetos (NICHOL *et al.*, 2002, MULENGA *et al.*, 2003, MULENGA *et al.*, 2004, HAJDUSEK *et al.*, 2009). Em ovários de fêmeas do carrapato *Dermacentor variabilis*, foi identificado um fragmento de cDNA com homologia com a cadeia pesada da ferritina (DVFER), cuja expressão é significativamente aumentada após as infecções com *Rickettsia montanensis*, *Escherichia coli* ou mesmo injúria (MULENGA *et al.*, 2003, MULENGA *et al.*, 2004). Em células embrionárias (IDE8) do carrapato *Ixodes scapularis*, foi observado um resultado oposto a este, ou seja, a expressão gênica da ferritina foi reprimida em resposta a infecção com *Anaplasma marginale* (DE LA FUENTE, BLOUIN *et al.*, 2007). Além da ferritina, outros transcritos relacionados ao sistema imune foram identificados na biblioteca de cDNA das células BME26, tais como, serina-proteinases e inibidores de proteinases (**Tabela 4**). Essas moléculas estão envolvidas na resposta à infecção por patógenos, como coagulação e melanização (KANOST, 1999), e também com a produção de peptídeos antimicrobianos (KAMBRIS *et al.*, 2006, WANG *et al.*, 2007).

Para explorarmos aspectos envolvidos na interação vetor-patógeno, as células BME26 foram infectadas com um patógeno que naturalmente é transmitido

pelo carrapato *R. (B.) microplus*, a riquetsia *Anaplasma marginale*. Ressaltamos que este foi o primeiro relato da literatura de células do carrapato *R. (B.) microplus* infectadas com *A. marginale*. Embora em estudos anteriores tenha sido demonstrado que a cepa UFMG1 de *A. marginale* não se desenvolve em fêmeas do carrapato *R. (B.) microplus* (RUIZ *et al.*, 2005), nossos resultados evidenciam claramente o estabelecimento da infecção em células BME26, que são provenientes desse carrapato. As primeiras colônias jovens de riquetsias no citoplasma das células BME26 foram detectadas com aproximadamente oito dias pós-infecção, sendo que observamos o aparecimento de colônias maduras em quatorze dias pós-infecção. No estabelecimento do cultivo de *A. marginale* (Am291), em células embrionárias do carrapato *Ixodes scapularis* (IDE8), foi relatado que na primeira passagem das riquetsias nas células, a replicação das *Anaplasmas* só foi observada com trinta e quatro dias após o início da infecção, atingindo nesse período um percentual de 30% de células infectadas. Porém, após a quinta passagem das riquetsias nas células, as bactérias tornaram-se mais adaptadas ao sistema de cultivo e se multiplicaram rapidamente infectando 100% das células em apenas três semanas (MUNDERLOH, BLOUIN *et al.*, 1996). Mesmo após várias passagens da *A. marginale* nas células BME26, verificamos que o percentual máximo de infecção é de aproximadamente 30%. É provável que em razão das células BME26 serem originárias do carrapato *R. (B.) microplus*, vetor natural dessa riquetsia, mecanismos de defesa estejam presentes no sentido de controlar eficazmente a infecção, permitindo a sobrevivência do vetor e consequentemente garantindo transmissão ao hospedeiro vertebrado. A invasão das *A. marginale* (Am291) nas células IDE8 ocorre 15 min após a infecção e, uma vez internalizadas, a bactéria permanece dentro do vacúolo e inicia a replicação por fissão binária formando colônias (BLOUIN e KOCAN, 1998). Com quatro dias após a infecção foi verificado que a membrana do vacúolo parasitário se funde com a membrana da célula hospedeira, liberando riquetsias para o exterior (BLOUIN e KOCAN, 1998). Nas células BME26, porém, verificamos riquetsias extracelularmente somente em vinte dias após a infecção sugerindo que o desenvolvimento da infecção seja mais lento do que observado em células IDE8.

Análises de expressão gênica mostraram que as células BME26 expressam constitutivamente os AMPs microplusina, defensina e ixodidina. No carrapato *R. (B.)*

microplus foi verificada a expressão gênica constitutiva da microplusina e da defensina nos hemócitos, corpo gorduroso ovários e ovos (FOGACA *et al.*, 2004, ESTEVES *et al.*, 2009). Nas células BME26 infectadas com *A. marginale*, a expressão gênica dos AMPs defensina e ixodidina é aumentada. Dados da literatura têm mostrado que em carrapatos a expressão gênica dos AMPs é modulada após o desafio com patógenos naturais. Em carrapatos *D. variabilis*, que é vetor natural da bactéria *Rickettsia montanensis*, foi observado um aumento da expressão gênica de duas isoformas da defensina (1 e 2) e da lisozima no corpo gorduroso e no intestino após o desafio com a riquetsia (CERAUL *et al.*, 2007). O mesmo foi observado através de uma biblioteca subtrativa realizada com o carrapato *Ixodes ricinus*, o principal vetor de *Borrelia burgdorferi* na Europa. Entre vários clones identificados na biblioteca os autores detectaram uma defensina que teve sua expressão gênica significativamente aumentada em intestino de carrapatos infectados por *B. burgdorferi* (RUDENKO *et al.*, 2005). Recentemente, foi mostrado também que as defensinas podem exercer um papel de controle da infecção por patógenos naturais em carrapatos. No intestino do carrapato *Haemaphysalis longicornis*, que é vetor natural de parasitas do gênero *Babesia*, foi identificada uma defensina que inibe a multiplicação desse protozoário *in vitro* e *in vivo*. Os autores verificaram que em carrapatos que possuíam o gene da defensina silenciado por RNAi e alimentados em cães infectados com *Babesia gibsoni*, houve um aumento significativo do número de parasitas no intestino e ovários desses carrapatos, em relação aos carrapatos com o gene da defensina não silenciado. Estes resultados mostraram que as defensinas, além de possuírem ação antifúngica e antibacteriana, também atuam na infecção por *Babesia* (TSUJI *et al.*, 2007).

Apesar dos genes que codificam a defensina e ixodidina terem sido modulados positivamente após o desafio com *A. marginale* não observamos nenhuma alteração na expressão gênica da microplusina em até 72 h pós-infecção (**Figura 11**). Entretanto, observamos o aumento da expressão gênica da microplusina nas células BME26 quando expostas a diferentes estímulos microbianos inativados por calor, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus luteus* e *Sacharomices cerevisiae* e LPS. Em linhagens de células em cultura dos carrapatos *I. scapularis* (IDE12) e *D. andersoni* (DAE15), foi demonstrado um aumento da expressão gênica da lisozima e da defensina, após o estímulo com as bactérias *E.*

coli e *M. luteus*, também inativadas por calor (MATTILA *et al.*, 2007). Interessantemente, quando ambas as linhagens foram infectadas com *Rickettsia peacockii*, um endossimbionte do carrapato *D. andersoni*, nenhuma alteração na expressão gênica dos AMPs foi observada. Os autores sugerem que a resposta imune do carrapato *D. andersoni*, não é alterada na presença microorganismos normalmente associados a ele (MATTILA *et al.*, 2007).

A modulação da expressão de cada um dos genes dos três AMPs nas células BME26 expostas aos diferentes desafios sugere a existência de mecanismos distintos de reconhecimento e ativação da expressão gênica desses peptídeos, como já descrito na mosca de fruta *Drosophila melanogaster* (HOFFMANN e REICHHART, 2002). Nesse díptero, a indução da expressão gênica dos AMPs é regulada por duas vias de sinalização intracelular: a via *Toll* e a via *Imd*, que são ativadas de acordo com o desafio microbiano. As infecções causadas por fungos e bactérias Gram-positivas estimulam a via *Toll*, e culmina na indução da expressão das drosomicinas, metchnikovinas e defensinas. Já as infecções por bactérias Gram-negativas estimulam a via *Imd*, culminando na indução da expressão dos genes das atacinas, cecropinas, dipterocinas e drosocinas (HOFFMANN e REICHHART, 2002). A modulação da expressão gênica de AMPs frente a diferentes estímulos e bactérias também foi verificada no carrapato *Ornithodoros moubata*. Na hemolinfa desse carrapato haviam sido identificadas quatro isoformas pertencentes à família das defensinas de invertebrados (NAKAJIMA *et al.*, 2001, 2002). Os autores verificaram que a expressão gênica das quatro isoformas da defensina foi aumentada em 12 h após o estímulo com ácido lipoteicoico, peptideoglicano e também no desafio com as bactérias *E. coli* e *M. luteus* (NAKAJIMA *et al.*, 2003). Em carrapatos *D. variabilis* infectados com espiroquetas *B. burgdorferi* também foi identificado um aumento dos transcritos da defensina em apenas 1 h após o desafio (CERAUL *et al.*, 2003). Além disso, em hemócitos desse mesmo carrapato foi detectado um aumento na expressão gênica da c-lisozima após o desafio com bactérias vivas *E. coli* e também em células embrionárias DAE100 do carrapato *D. andersoni* infectadas com essa mesma bactéria porém inativada por calor (SIMSER *et al.*, 2004).

O tratamento das células BME26 com dsRNA dos genes dos AMPs produziu um percentual de silenciamento satisfatório dos genes da microplusina e da defensina. Por outro lado, não observamos redução dos transcritos da ixodidina em

células BME26 tratadas com dsRNA desse gene. É provável, que o tratamento com dsRNA da ixodidina não tenha sido suficiente para suprimir a expressão de todas as isoformas do peptídeo que podem supostamente existir nas células BME26. Entretanto, apesar de termos observado uma significativa redução dos transcritos da microplusina e da defensina, não detectamos diferenças na infecção por *A. marginale* nas células tratadas com as respectivas dsRNA em relação a células tratadas com controles. Como mencionado anteriormente, nossos resultados mostraram que nas células BME26 o desenvolvimento da infecção por *A. marginale* é mais lento que em outras linhagens celulares já estudadas (BLOUIN e KOCAN, 1998). Uma vez que ação dos peptídeos antimicrobianos é no meio extracelular e as riquétsias só começam a ser liberadas das células aproximadamente quatorze dias após a infecção, é possível que o período em que o número de riquétsias foi avaliado nas células BME26 silenciadas (72 h) não tenha sido suficiente para avaliar se o silenciamento dos genes da microplusina e/ou defensina pode afetar a infecção e/ou multiplicação da bactérias. Para confirmarmos essa hipótese é necessário que o número de riquétsias seja avaliado em um tempo maior após o silenciamento dos genes, verificando também quanto tempo é possível que as células mantenham o efeito do silenciamento gênico. Devemos considerar ainda que por se tratar de bactérias intracelulares obrigatórias, as mesmas devem possuir mecanismos eficazes para evitar o sistema imune do hospedeiro ou do vetor, possibilitando o estabelecimento e multiplicação da infecção, tal como foi descrito na literatura para *A. phagocytophilum* e *E. chaffeensis* (LIN e RIKIHISA, 2003, BRAYTON *et al.*, 2005, RIKIHISA, 2006).

Na análise da biblioteca dos genes diferencialmente expressos nas células BME26 infectadas com *A. marginale*, foram detectadas muitas sequências com similaridade com proteínas associadas à replicação e ao capsídeo viral. Esse resultado nos surpreendeu visto que não havíamos encontrado sequências de vírus na biblioteca de cDNA construída anteriormente com as células BME26 (ESTEVES *et al.*, 2008). As espécies de vírus com o qual essas sequências demonstraram maior similaridade pertencem à família *Tymoviridae*, que é formada pelos gêneros: *Tymovirus*, *Marafivirus* e *Maculavirus*, sendo este último um novo gênero representado pelo vírus de planta *Grapevine fleck vírus (GFkV)* (MARTELLI *et al.*, 2002). Em uma linhagem de células do bicho da seda *Bombix mori*, denominada

BmN, foi detectada a presença de um vírus, sendo que comparação da sequência protéica codificada pelo RNA do vírus mostrou alta homologia com proteínas associadas a replicases e capsídeo viral também de membros da família *Tymoviridae* (KATSUMA *et al.*, 2005). Os autores verificaram ainda a presença latente do vírus em outras linhagens celulares do bicho da seda, tendo denominado esse vírus de *Bombyx mori macula-like latent virus* (BmMLV) (KATSUMA *et al.*, 2005). Interessantemente, nós também verificamos partículas virais nas células BME26 livres de infecção, sugerindo que o vírus esteja latente nas células BME26, sendo que a expressão do gene de capsídeo viral é aumentada após a infecção com *A. marginale*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conjunto de dados obtidos nos permitem concluir que a linhagem de células embrionárias BME26 é um excelente modelo para o estudo de vários aspectos da interação patógeno-vetor, entre outros, o aspecto imunológico. Além disso, mostramos que as células BME26 são susceptíveis a propagação do patógeno *Anaplasma marginale*. Apesar de outras tentativas terem sido realizadas até mesmo com carrapatos vetores naturais dessa riquétzia (MUNDERLOH, BLOUIN *et al.*, 1996), até hoje o cultivo deste patógeno *in vitro*, só havia sido mostrado em células de carrapatos não vetores da mesma.

A modulação da expressão dos genes dos AMPs frente aos diferentes microorganismos sugere um mecanismo de regulação gênica diferencial, regido por diferentes vias de sinalização. A elucidação dessas vias poderá ser explorada nas células BME26 através da técnica de RNA de interferência, que pelos nossos resultados de silenciamento gênico, mostrou ser uma ferramenta metodológica potente. Além disso, várias proteínas relacionadas ao processamento da via de RNAi têm sido caracterizadas nas células BME26 (KURSCHEID *et al.*, 2009), o que pode permitir um melhor entendimento de vários processos celulares.

O vírus detectado nas células BME26, apesar de ter impedido a identificação de genes diferencialmente expressos na infecção por *A. marginale*, vai permitir a exploração da resposta imunológica de carrapatos frente a infecções causadas por vírus, pois pouco se conhece na literatura sobre isso. Além disso, pretendemos brevemente obter o genoma completo desse vírus, pois como se trata de um organismo que infecta naturalmente as células BME26, poderá ser utilizado como uma ferramenta para inserção de genes de interesse em seu genoma, com o objetivo de expressar proteínas exógenas e verificar seus efeitos em cultura de células ou carrapatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AKIRA, S., UEMATSU, S., TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v.124, n.4, p.783-801, 2006.

ALMAZAN, C., KOCAN, K. M., BERGMAN, D. K., GARCIA-GARCIA, J. C., BLOUIN, E. F., DE LA FUENTE, J. Identification of protective antigens for the control of Ixodes scapularis infestations using cDNA expression library immunization. **Vaccine**, v.21, n.13-14, p.1492-501, 2003.

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v.25, n.17, p.3389-402, 1997.

ASHBURNER, M., BALL, C. A., BLAKE, J. A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H., CHERRY, J. M., DAVIS, A. P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S. S., EPPIG, J. T., HARRIS, M. A., HILL, D. P., ISSEL-TARVER, L., KASARSKIS, A., LEWIS, S., MATESE, J. C., RICHARDSON, J. E., RINGWALD, M., RUBIN, G. M., SHERLOCK, G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nat. Genet.**, v.25, n.1, p.25-9. 2000.

BASTOS, C. V., DAS VASCONCELOS, M. M., RIBEIRO, M. F., PASSOS, L. M. Use of refrigeration as a practical means to preserve viability of in vitro-cultured IDE8 tick cells. **Exp. Appl. Acarol.**, v.39, n.3-4, p.347-52, 2006.

BELL-SAKYI, L. Ehrlichia ruminantium grows in cell lines from four ixodid tick genera. **J. Comp. Pathol.**, v.130, n.4, p.285-93. 2004.

BELL-SAKYI, L.; PAXTON, E. A.; MUNDERLOH, U. G.; SUMPTION, K. J. Growth of Cowdria ruminantium, the causative agent of heartwater, in a tick cell line. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.3, p.1238-40, 2000.

BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOUIN, E. F.; GOULD, E. A.; JONGEJAN, F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. **Trends Parasitol.**, v.23, n.9, p.450-7, 2007.

BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F., YI, J.; KOCAN, K. M.; SALIKI, J. T. Establishment and characterization of an Oklahoma isolate of Anaplasma marginale in cultured Ixodes scapularis cells. **Vet. Parasitol.**, v.87, n.4, p.301-313, 2000.

BLOUIN, E. F.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; SAUER, J. R.; SALIKI, J. T.; KOCAN, K. M. Applications of a cell culture system for studying the interaction

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

of *Anaplasma marginale* with tick cells. **Anim. Health Res. Rev.**, v.3, n.2, p.57-68, 2002.

BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari : Ixodidae) cells. **J. Med. Entomol.**, v.35, n.5, p.788-797, 1998.

BLOUIN, E. F.; SALIKI, J. T.; KOCAN, K. M.; RODGERS, S. J. Evaluation of *Anaplasma marginale* from tick cell culture as an immunogen for cattle. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.849, p.253-8, 1998.

BRAYTON, K. A.; KAPPMAYER, L. S.; HERNDON, D. R.; DARK, M. J.; TIBBALS, D. L.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P.; JR. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.102, n.3, p.844-9. 2005.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat. Rev. Microbiol.**, v.3, n.3, p.238-50, 2005.

BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol. Rev.**, v.198, p.169-84, 2004.

CERAUL, S. M.; DREHER-LESNICK, S. M.; GILLESPIE, J. J.; RAHMAN, M. S.; AZAD, A. F. New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. **Infect. Immun.**, v.75, n.4, p.1973-83, 2007.

CERAUL, S. M.; SONENSHINE, D. E.; RATZLAFF, R. E.; HYNES, W. L. An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.33, n.11, p.1099-103, 2003.

CLAGUE, M. J. Molecular aspects of the endocytic pathway. **Biochem. J.**, v.336 (Pt 2), p.271-82, 1998.

DA SILVA VAZ, I., JR.; LOGULLO, C.; SORGINE, M.; VELLOSO, F. F.; ROSA DE LIMA, M. F.; GONZALES, J. C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P. L.; MASUDA, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.66, n.3-4, p.331-41, 1998.

DE LA FUENTE, J.; ALMAZAN, C.; CANALES, M.; PEREZ DE LA LASTRA, J. M.; KOCAN, K. M.; WILLADSEN, P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. **Anim. Health Res. Rev.**, v.8, n.1, p.23-8, 2007.

DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; MANZANO-ROMAN, R.; NARANJO, V.; ALMAZAN, C.; PEREZ DE LA LASTRA, J. M.; ZIVKOVIC, Z.; JONGEJAN, F.;

KOCAN, K. M. Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. **Genomics**, v.90, n.6, p.712-22, 2007.

DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PENA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M.; SONENSHINE, D. E. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Front. Biosci.**, v.13, p.6938-46, 2008.

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; CLAYPOOL, P. L.; SALIKI, J. T. Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. **Vet. Microbiol.**, v.89, n.2-3, p.239-251, 2002.

DE LA FUENTE, J.; RODRÍGUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; GARCIA-GARCIA, J. C.; MÉNDEZ, L.; SERRANA, E. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with GavacTM against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v.16, p.366-373, 1988.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, n.12, p.6025-30, 1996.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.51, n.Pt 6, p.2145-65, 2001.

ESTEVEES, E.; FOGACA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F. D.; MANSO, P. P.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Dev. Comp. Immunol.**, v.33, n.8, p.913-9, 2009.

ESTEVEES, E.; LARA, F. A.; LORENZINI, D. M.; COSTA, G. H.; FUKUZAWA, A. H.; PRESSINOTTI, L. N.; SILVA, J. R.; FERRO, J. A.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; DAFFRE, S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.38, n.5, p.568-80, 2008.

FOGACA, A. C.; ALMEIDA, I. C.; EBERLIN, M. N.; TANAKA, A. S.; BULET, P.; DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, v.27, n.4, p.667-74, 2006.

FOGACA, A. C.; DA SILVA, P. I.; JR., MIRANDA, M. T.; BIANCHI, A. G.; MIRANDA,

A.; RIBOLLA, P. E.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.36, p.25330-4, 1999.

FOGACA, A. C.; LORENZINI, D. M.; KAKU, L. M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Dev. Comp. Immunol.**, v.28, n.3, p.191-200, 2004.

FUKUZAWA, A. H.; VELLUTINI, B. C.; LORENZINI, D. M.; SILVA, P. I.; JR.; MORTARA, R. A.; DA SILVA, J. M.; DAFFRE, S. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Dev. Comp. Immunol.**, v.32, n.6, p.716-25, 2008.

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 2ª ed. São Paulo, 1995.

GOODMAN, J. L.; NELSON, C.; VITALE, B.; MADIGAN, J. E.; DUMLER, J. S.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. **N. Engl. J. Med.**, v.334, n.4, p.209-15, 1996.

GOUMON, Y.; STRUB, J. M.; MONIATTE, M.; NULLANS, G.; POTEUR, L.; HUBERT, P.; VAN DORSSELAER, A.; AUNIS, D.; METZ-BOUTIGUE, M. H. The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. **Eur. J. Biochem.**, v.235, n.3, p.516-25, 1996.

HAJDUSEK, O.; SOJKA, D.; KOPACEK, P.; BURESOVA, V.; FRANTA, Z.; SAUMAN, I.; WINZERLING, J.; GRUBHOFFER, L. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.106, n.4, p.1033-8, 2009.

HAWKINS, J. A.; LOVE, J. N.; HIDALGO, R. J. Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). **Am. J. Vet. Res.**, v.43, n.4, p.732-4, 1982.

HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. **Nat Immunol**, v.3, n.2, p.121-6, 2002.

HORN, S. C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. **Boletim de Defesa Sanitária Animal do Ministério da Agricultura**, 1983.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v.38, n.2, p.128-50, 2005.

JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.31, n.9, p.857-65, 2001.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**,

v.129, p.S3-14, 2004. Suppl.

JONSSON, N. N.; MAYER, D. G.; MATSCHOSS, A. L.; GREEN, P. E.; ANSELL, J. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. **Vet. Parasitol.**, v.78, n.1, p.65-77, 1998.

KAMBRIS, Z.; BRUN, S.; JANG, I. H.; NAM, H. J.; ROMEO, Y.; TAKAHASHI, K.; LEE, W. J.; UEDA, R.; LEMAITRE, B. Drosophila immunity: a large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation. **Curr. Biol.**, v.16, n.8, p.808-13, 2006.

KANOST, M. R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Dev. Comp. Immunol.**, v.23, n.4-5, p.291-301, 1999.

KATSUMA, S.; TANAKA, S.; OMURO, N.; TAKABUCHI, L.; DAIMON, T.; IMANISHI, S.; YAMASHITA, S.; IWANAGA, M.; MITA, K.; MAEDA, S.; KOBAYASHI, M. SHIMADA, T. Novel macula-like virus identified in Bombyx mori cultured cells. **J. Virol.**, v.79, n.9, p.5577-84, 2005.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão *Anaplasma marginale*. **Pesq. Vet. Bras.**, v.21, n.4, p.177-179, 2001.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F. Targeting the tick/pathogen interface for developing new anaplasmosis vaccine strategies. **Vet. Res. Commun.**, v.31, p.91-6, 2007, Suppl. 1.

_____. Advances toward understanding the molecular biology of the *Anaplasma*-tick interface. **Front. Biosci.**, v.13, p.7032-45, 2008.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Vet. Parasitol.**, 2009.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; GARCIA-GARCIA, J. C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales : Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v.129, p.S285-S300, 2004.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELENDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.16, n.4, p.698-+, 2003.

KOCAN, K. M.; GOFF, W. L.; STILLER, D.; CLAYPOOL, P. L.; EDWARDS, W.; EWING, S. A.; HAIR, J. A.; BARRON, S. J. Persistence of *Anaplasma-Marginale* (Rickettsiales, Anaplasmataceae) in Male *Dermacentor-Andersoni* (Acari, Ixodidae) Transferred Successively from Infected to Susceptible Calves. **J. Med. Entomol.**, v.29, n.4, p.657-668, 1992.

KOCAN, K. M.; HALBUR, T.; BLOUIN, E. F.; ONET, V.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; SALIKI, J. T. Immunization of cattle with *Anaplasma*

marginale derived from tick cell culture. **Vet. Parasitol.**, v.102, n.1-2, p.151-61, 2001.

KOCAN, K. M.; MUNDERLOH, U.G.; EWING,, S.A. Development of the Ebony isolate of Ehrlichia canis in cultured Ixodes scapularis cells. In: PROCEEDINGS OF THE CONFERENCE OF RESEARCH WORKERS IN ANIMAL DISEASES CHICAGO 79, 1998, Chicago. **Abstract...** Chicago, 1998. n. 95.

KOCAN, K. M.; STILLER, D.; GOFF, W. L.; CLAYPOOL, P. L.; EDWARDS, W.; EWING, S. A.; MCGUIRE, T. C.; HAIR, J. A.; BARRON, S. J. Development of Anaplasma marginale in male Dermacentor andersoni transferred from parasitemic to susceptible cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, n.4, p.499-507, 1992.

KURSCHEID, S.; LEW-TABOR, A. E.; RODRIGUEZ VALLE, M.; BRUYERES, A. G.; DOOGAN, V. J.; MUNDERLOH, U. G.; GUERRERO, F. D.; BARRERO, R. A.; BELLGARD, M. I. Evidence of a tick RNAi pathway by comparative genomics and reverse genetics screen of targets with known loss-of-function phenotypes in Drosophila. **BMC. Mol. Biol.**, v.10, p.26,. 2009.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; KRUEGER, D. E.; JOHNSON, R. C.; SCHWAN, T. G. Adhesion to and invasion of cultured tick (Acarina: Ixodidae) cells by Borrelia burgdorferi (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and maintenance of infectivity. **J. Med. Entomol.**, v.30, n.3, p.586-96, 1993.

LABARTA, V.; RODRIGUEZ, M.; PENICHET, M.; LLEONART, R.; LUACES, L. L.; DE LA FUENTE, J. Simulation of control strategies for the cattle tick Boophilus microplus employing vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation. **Vet. Parasitol.**, v.63, n.1-2, p.131-60, 1996.

LABRUNA, M. B.; VERISSÍMO, C. J. Observações sobre a infestação por Boophilus microplus (Acari:Ixodidae) em bovinos mantidos em rotação de pastagem, sob alta densidade animal. **Arq. Inst. Biol.**, v.68, n.2, p.115-120, 2001.

LAI, R.; TAKEUCHI, H.; LOMAS, L. O.; JONCZY, J.; RIGDEN, D. J.; REES, H. H.; TURNER, P. C. A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, Amblyomma hebraeum. **FASEB J.**, v.18, n.12, p.1447-9, 2004.

LARA, F. A.; LINS, U.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. L. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick Boophilus microplus. **J. Exp. Biol.**, v.208, n.Pt 16, p.3093-101, 2005.

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

LIN, M.; RIKIHISA, Y. Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma phagocytophilum lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. **Infect. Immun.**, v.71, n.9, p.5324-31, 2003.

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

p.402-8, 2001.

LOGULLO, C.; VAZ IDA, S.; SORGINE, M. H.; PAIVA-SILVA, G. O.; FARIA, F. S.; ZINGALI, R. B.; DE LIMA, M. F.; ABREU, L.; OLIVEIRA, E. F.; ALVES, E. W.; MASUDA, H.; GONZALES, J. C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P. L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v.116, p.525-32, 1998, Part 6.

LORENZINI, D. M.; DA SILVA, P. I.; JR., SOARES, M. B.; ARRUDA, P.; SETUBAL, J.; DAFFRE, S. Discovery of immune-related genes expressed in hemocytes of the tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Dev. Comp. Immunol.**, v.30, n.6, p.545-56, 2006.

LORENZINI, D. M.; FUKUZAWA, A. H.; DA SILVA, P. I., JR.; MACHADO-SANTELLI, G.; BIJOVSKY, A. T.; DAFFRE, S. Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an anti-microbial peptide from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.33, n.10, p.1011-6, 2003.

MACHADO, A., SFORCA, M. L.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; MIRANDA, M. T. Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine alpha-hemoglobin: effects on the structure and anticandidal activity. **Biopolymers**, v.88, n.3, p.413-26, 2007.

MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among *Metastrata* (Acari: Ixodidae). **Parasitol. Res.**, v.84, n.6, p.478-84, 1998.

MANS, B. J.; ANDERSEN, J. F.; FRANCISCHETTI, I. M.; VALENZUELA, J. G.; SCHWAN, T. G.; PHAM, V. M.; GARFIELD, M. K.; HAMMER, C. H.; RIBEIRO, J. M. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.38, n.1, p.42-58, 2008.

MARTELLI, G. P.; SABANADZOVIC, S.; ABOU-GHANEM SABANADZOVIC, N., EDWARDS; M. C., DREHER, T. The family Tymoviridae. **Arch. Virol.**, v.147, n.9, p.1837-46, 2002.

MASON, C. A. A. N.; R.A.I. The transfer of *Boophilus microplus* (ACARINA: IXODIDAE) from infested to uninfested cattle under field conditions. **Vet. Parasitol.**, v.8, p.185-188, 1981.

MATTILA, J. T.; MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. *Rickettsia peacockii*, an endosymbiont of *Dermacentor andersoni*, does not elicit or inhibit humoral immune responses from immunocompetent *D. andersoni* or *Ixodes scapularis* cell lines. **Dev. Comp. Immunol.**, v.31, n.11, p.1095-106, 2007.

MULENGA, A.; BLANDON, M.; KHUMTHONG, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Exp. Appl. Acarol.**, v.41, n.4,

p.267-87, 2007.

MULENGA, A.; MACALUSO, K. R.; SIMSER, J. A.; AZAD, A. F. Dynamics of Rickettsia-tick interactions: identification and characterization of differentially expressed mRNAs in uninfected and infected Dermacentor variabilis. **Insect Mol. Biol.**, v.12, n.2, p.185-93, 2003.

MULENGA, A.; SIMSER, J. A.; MACALUSO, K. R.; AZAD, A. F. Stress and transcriptional regulation of tick ferritin HC. **Insect. Mol. Biol.**, v.13, n.4, p.423-33, 2004.

MUNDERLOH, U. G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; GE, N. L.; EDWARDS, W. L.; KURTTI, T. J. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. **J. Med. Entomol.**, v.33, n.4, p.656-664, 1996.

MUNDERLOH, U. G.; JAURON, S. D.; FINGERLE, V.; LEITRITZ, L.; HAYES, S. F.; HAUTMAN, J. M.; NELSON, C. M.; HUBERTY, B. W.; KURTTI, T. J.; AHLSTRAND, G. G.; GREIG, B.; MELLENCAMP, M. A.; GOODMAN, J. L. Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.8, p.2518-24, 1999.

MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Formulation of medium for tick cell culture. **Exp. Appl. Acarol.**, v.7, n.3, p.219-29, 1989.

MUNDERLOH, U. G.; LIU, Y.; WANG, M.; CHEN, C.; KURTTI, T. J. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick Ixodes scapularis. **J. Parasitol.**, v.80, n.4, p.533-43, 1994.

MUNDERLOH, U. G.; MADIGAN, J. E.; DUMLER, J. S.; GOODMAN, J. L.; HAYES, S. F.; BARLOUGH, J. E.; NELSON, C. M.; KURTTI, T. J. Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, Ehrlichia equi, in tick cell culture. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, n.3, p.664-70, 1996.

NAKAJIMA, Y.; SAIDO-SAKANAKA, H.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Up-regulated humoral immune response in the soft tick, Ornithodoros moubata (Acari: Argasidae). **Parasitol. Res.**, v.91, n.6, p.476-81, 2003.

NAKAJIMA, Y.; VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI, A.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, Ornithodoros moubata (Acari: Argasidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.31, n.8, p.747-51, 2001.

_____. Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, Ornithodoros moubata. **Insect. Mol. Biol.**, v.11, n.6, p.611-8. 2002.

NAPPI, A. J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioessays**, v.22, n.5, p.469-80, 2000.

NICHOL, H.; LAW, J. H.; WINZERLING, J. J. Iron metabolism in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v.47, p.535-59, 2002.

PATARROYO, J. H.; PORTELA, R. W.; DE CASTRO, R. O.; PIMENTEL, J. C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; VARGAS, M. I.; PRATES, A. A.; MENDES, M. A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.88, n.3-4, p.163-72, 2002.

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

RIBEIRO, M. F.; PASSOS, L. M.; GUIMARAES, A. M. Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.70, n.4, p.271-7, 1997.

RIKIHISA, Y. Ehrlichia subversion of host innate responses. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.9, n.1, p.95-101, 2006.

RODRIGUEZ, M.; MASSARD, C. L.; DA FONSECA, A. H.; RAMOS, N. F.; MACHADO, H.; LABARTA, V.; DE LA FUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, v.13, n.18, p.1804-8, 1995.

RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; EDWARDS, M. J.; GRUBHOFFER, L. Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. **J. Med. Entomol.**, v.42, n.1, p.36-41, 2005.

RUIZ, P. M.; PASSOS, L. M.; RIBEIRO, M. F. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. **Vet. Parasitol.**, v.128, n.3-4, p.325-31, 2005.

SALIKI, J. T.; BLOUIN, E. F.; RODGERS, S. J.; KOCAN, K. M. Use of tick cell culture-derived *Anaplasma marginale* antigen in a competitive ELISA for serodiagnosis of anaplasmosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.849, p.273-81, 1998.

SCHLUNS, H.; CROZIER, R. H. Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. **Insect Mol. Biol.**, v.16, n.6, p.753-9, 2007.

SFORCA, M. L.; MACHADO, A.; FIGUEREDO, R. C.; OYAMA, S.; JR.; SILVA, F. D.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MIRANDA, M. T.; SPISNI, A.; PERTINHEZ, T. A. The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. **Biochemistry**, v.44, n.17, p.6440-51, 2005.

SILVA, F. D.; REZENDE, C. A.; ROSSI, D. C.; ESTEVES, E.; DYSZY, F. H.; SCHREIER, S.; GUEIROS-FILHO, F.; BARBOSA, C.; PIRES, J. R.; DAFFRE, S.

Structure and mode of action of microplusin, a copper II chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*. **J. Biol. Chem.** 2009.

SILVA, J. R. M. C.; STAINNESS, N.; HERNANDEZ-BLASQUEZ, F. J. Experimental studies on the response of the fish (*Nothothenia corticeps*, Richardson, 1844) to parasite (*Pseudoterranova decipiens*, Krabbe, 1878) and other irritant stimuli at Antarctic temperatures. **Polar Biol.**, v.22, p.417-424, 1999.

SIMSER, J. A.; MACALUSO, K. R.; MULENGA, A.; AZAD, A. F. Immune-responsive lysozymes from hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* and an embryonic cell line of the Rocky Mountain wood tick, *D. andersoni*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.34, n.12, p.1235-46, 2004.

SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; HYNES, W. E.; MACALUSO, K. R.; AZAD, A. F. Expression of defensin-like peptides in tick hemolymph and midgut in response to challenge with *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Exp. Appl. Acarol.**, v.28, n.1-4, p.127-34, 2002.

SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. **Front. Biosci.**, v.13, p.7046-63, 2008.

TAYLOR, D. Innate Immunity in Ticks: A review. **J. Acarol. Soc. Jpn.**, v.15, n.2, p.109-127, 2006.

TSUJI, N.; BATTSETSEG, B.; BOLDBAATAR, D.; MIYOSHI, T.; XUAN, X.; OLIVER, J. H.; JR., FUJISAKI, K. Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. **Infect. Immun.**, v.75, n.7, p.3633-40, 2007.

VARMA, M. G.; PUDNEY, M.; LEAKE, C. J. The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arboviruses. **J. Med. Entomol.**, v.11, n.6, p.698-706, 1975.

VERGA FALZACAPPA, M. V.; MUCKENTHALER, M. U. Hepcidin: iron-hormone and anti-microbial peptide. **Gene**, v.364, p.37-44, 2005.

WANG, Y.; CHENG, T.; RAYAPROLU, S.; ZOU, Z.; XIA, Q.; XIANG, Z.; JIANG, H. Proteolytic activation of pro-spatzle is required for the induced transcription of antimicrobial peptide genes in lepidopteran insects. **Dev. Comp. Immunol.**, v.31, n.10, p.1002-12, 2007.

WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G. S.; HUNGERFORD, J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v.110 Suppl, p.S43-50, 1995.

WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. **Parasitol. Today**, v.15, n.7, p.258-62, 1999.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. Novel vaccination for control of the *Babesia* vector,

Boophilus microplus. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.83 Suppl, p.107, 1989.

YOUNT, N. Y.; BAYER, A. S.; XIONG, Y. Q.; YEAMAN, M. R. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. **Biopolymers**, v.84, n.5, p.435-58, 2006.

Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Eliane Esteves^a, Flavio A. Lara^b, Daniel M. Lorenzini^{a,1}, Gustavo H.N. Costa^c,
Aline H. Fukuzawa^a, Luis N. Pressinotti^d, José Roberto M.C. Silva^d, Jesus A. Ferro^c,
Timothy J. Kurtti^e, Ulrike G. Munderloh^e, Sirlei Daffre^{a,*}

^aDepartamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

^bInstituto de Bioquímica Médica, Programa de Biotecnologia e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

^cDepartamento de Tecnologia, FCAV, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. P.D. Castellane km 5, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil

^dDepartamento de Biologia Celular e Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

^eDepartment of Entomology, University of Minnesota, Saint Paul, MN 55108, USA

Received 7 October 2007; received in revised form 25 January 2008; accepted 30 January 2008

Abstract

The cellular and molecular characteristics of a cell line (BME26) derived from embryos of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* were studied. The cells contained glycogen inclusions, numerous mitochondria, and vesicles with heterogeneous electron densities dispersed throughout the cytoplasm. Vesicles contained lipids and sequestered palladium meso-porphyrin (Pd-mP) and rhodamine-hemoglobin, suggesting their involvement in the autophagic and endocytic pathways. The cells phagocytosed yeast and expressed genes encoding the antimicrobial peptides (microplusin and defensin). A cDNA library was made and 898 unique mRNA sequences were obtained. Among them, 556 sequences were not significantly similar to any sequence found in public databases. Annotation using Gene Ontology revealed transcripts related to several different functional classes. We identified transcripts involved in immune response such as ferritin, serine proteases, protease inhibitors, antimicrobial peptides, heat shock protein, glutathione S-transferase, peroxidase, and NADPH oxidase. BME26 cells transfected with a plasmid carrying a red fluorescent protein reporter gene (DsRed2) transiently expressed DsRed2 for up to 5 weeks. We conclude that BME26 can be used to experimentally analyze diverse biological processes that occur in *R. (B.) microplus* such as the innate immune response to tick-borne pathogens.
© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Tick; Embryonic cells; Immunity; Transfection; *Sleeping Beauty*; DsRed2 gene

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Short communication

Propagation of a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage in a tick cell line (BME26) derived from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

E. Esteves^a, C.V. Bastos^b, Z. Zivkovic^c, J. de La Fuente^{d,e}, K. Kocan^d, E. Blouin^d, M.F.B. Ribeiro^b, L.M.F. Passos^{f,g}, S. Daffre^{a,*}

^a Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes 1374, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Parasitologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^c Utrecht Centre for Tick-borne Diseases (UCTD), Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

^d Department of Veterinary Pathobiology, Center for Veterinary Health Sciences, Oklahoma State University, Oklahoma, USA

^e Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Ciudad Real, Spain

^f Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^g Institute for Comparative Tropical Medicine and Parasitology, LMU, Munich, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2008

Received in revised form 6 December 2008

Accepted 6 December 2008

Keywords:

Anaplasma marginale

Tick cell culture

Rhipicephalus (Boophilus) microplus

ABSTRACT

Anaplasma marginale is a tick-borne pathogen of cattle responsible for the disease anaplasmosis. Data suggest that *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *R. annulatus* may be the major tick vectors of *A. marginale* in tropical and subtropical regions of the world. In this work we demonstrated the first infection and propagation of a Brazilian isolate of *A. marginale* (UFMG1) in the BME26 cell line derived originally from embryos of *R. (Boophilus) microplus*. The establishment of *A. marginale* infection in a cell line derived from *R. (Boophilus) microplus* is relevant for studying the *A. marginale*/tick interface.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dci

Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis

E. Esteves^a, A.C. Fogaça^a, R. Maldonado^{a,1}, F.D. Silva^a, P.P.A. Manso^b,
M. Pelajo-Machado^b, D. Valle^{c,d}, S. Daffre^{a,*}

^a Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508-900 São Paulo, Brazil

^b Laboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4365, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Instituto de Biologia do Exército, IBEx, Laboratório de Entomologia, Rua Francisco Manuel, 102, CEP 20911-270, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodos Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4365, CEP 21045-900 Mangunhins, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 November 2008
Received in revised form 18 February 2009
Accepted 26 February 2009
Available online 18 March 2009

Keywords:
Antimicrobial peptides
Tick
Microplusin
Eggs
Embryos
Rhipicephalus (Boophilus) microplus

ABSTRACT

Arthropods display different mechanisms to protect themselves against infections, among which antimicrobial peptides (AMPs) play an important role, acting directly against invader pathogens. We have detected several factors with inhibitory activity against *Candida albicans* and *Micrococcus luteus* on the surface and in homogenate of eggs of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. One of the anti-*M. luteus* factors of the egg homogenate was isolated to homogeneity. Analysis by electrospray mass spectrometry (ESI-MS) revealed that it corresponds to microplusin, an AMP previously isolated from the cell-free hemolymph of *R. (B.) microplus*. Reverse transcription (RT) quantitative polymerase chain reactions (qPCR) showed that the levels of microplusin mRNA gradually increase along ovary development, reaching an impressive highest value three days after the adult females have dropped from the calf and start oviposition. Interestingly, the level of microplusin mRNA is very low in recently laid eggs. An enhance of microplusin gene expression in eggs is observed only nine days after the onset of oviposition, achieving the highest level just before the larva hatching, when the level of expression decreases once again. Fluorescence microscopy analysis using an anti-microplusin serum revealed that microplusin is present among yolk granules of oocytes as well as in the connecting tube of ovaries. These results, together to our previous data, suggest that microplusin may be involved not only in protection of adult female hemocele, but also in protection of the female reproductive tract and embryos, what points this AMP as a considerable target for development of new methods to control *R. (B.) microplus* as well as the vector-borne pathogens.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpb Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathwayLeonardo Araujo de Abreu^a, Arianne Fabres^a, Eliane Esteves^b, Aoi Masuda^d, Itabajara da Silva Vaz Jr.^c, Sirlei Daffre^b, Carlos Logullo^{a,*}^a Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, CBB, Universidade Estadual Norte Fluminense, 28013-620, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil^b Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil^c Faculdade de Veterinária and Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil^d Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2008

Received in revised form 26 February 2009

Accepted 26 February 2009

Available online 5 March 2009

Keywords:

PI3K

GSK3

BME26 cell line

Signal transduction

Tick

Embryogenesis

Glycogen

Insulin

ABSTRACT

Ticks are obligatory blood-feeding arthropods and important vectors of both human and animal disease agents. Besides its metabolic role, insulin signaling pathway (ISP) is widely described as crucial for vertebrate and invertebrate embryogenesis, development and cell survival. In such cascade, Phosphatidylinositol 3-OH Kinase (PI3K) is hierarchically located upstream Protein Kinase B (PKB). To study the insulin-triggered pathway and its possible roles during embryogenesis we used a culture of embryonic *Rhipicephalus microplus* cells (BME26). Exogenous insulin elevated cell glycogen content in the absence of fetal calf serum (FCS) when compared to cells without treatment. Moreover, in the presence of PI3K inhibitors (Wortmannin or LY294002) these effects were blocked. We observed an increase in the relative expression level of PI3K's regulatory subunit (p85), as determined by qRT-PCR. In the presence of PI3K inhibitors these effects on transcription were also reversed. Additionally, treatment with Wortmannin increased the expression level of the insulin-regulated downstream target glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β). The p85 subunit showed elevated transcription levels in ovaries from fully engorged females, but was differentially expressed during tick embryogenesis. These results strongly suggest the presence of an insulin responsive machinery in BME26 cells, and its correlation with carbohydrate/glycogen metabolism also during embryogenesis.

© 2009 Published by Elsevier Inc.

ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Review

Functional genomics and evolution of tick–*Anaplasma* interactions and vaccine development

José de la Fuente^{a,b,*}, Katherine M. Kocan^a, Edmour F. Blouin^a, Zorica Zivkovic^c,
Victoria Naranjo^{a,b}, Consuelo Almazán^f, Eliane Esteves^d, Frans Jongejans^{c,e},
Sirlei Daffre^d, Atilio J. Mangold^g

^a Department of Veterinary Pathobiology, Center for Veterinary Health Sciences, Oklahoma State University, Stillwater, OK 74078, USA

^b Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Ronda de Toledo s/n, 13005 Ciudad Real, Spain

^c Utrecht Centre for Tick-borne Diseases (UCTD), Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Yalelaan 1, 3584CL, Utrecht, The Netherlands

^d Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil

^e Department of Veterinary Tropical Diseases, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, Private Bag X04, 0110, Onderstepoort, South Africa

^f Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Km. 5 carretera Victoria-Mante, CP 87000 Cd. Victoria, Tamaulipas, Mexico

^g Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, CC 22, CP 2300 Rafaela, Santa Fe, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Anaplasma
Major surface protein
Genomics
RNA interference
Evolution
Vaccine

ABSTRACT

The genus *Anaplasma* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) includes several tick-transmitted pathogens that impact veterinary and human health. Tick-borne pathogens cycle between tick vectors and vertebrate hosts and their interaction is mediated by molecular mechanisms at the tick–pathogen interface. These mechanisms have evolved characteristics that involve traits from both the tick vector and the pathogen to insure their mutual survival. Herein, we review the information obtained from functional genomics and genetic studies to characterize the tick–*Anaplasma* interface and evolution of *A. marginale* and *A. phagocytophilum*. *Anaplasma* and tick genes and proteins involved in tick–pathogen interactions were characterized. The results of these studies demonstrated that common and *Anaplasma* species-specific molecular mechanism occur by which pathogen and tick cell gene expression mediates or limits *Anaplasma* developmental cycle and trafficking through ticks. These results have advanced our understanding of the biology of tick–*Anaplasma* interactions and have opened new avenues for the development of improved methods for the control of tick infestations and the transmission of tick-borne pathogens.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

STRUCTURE AND MODE OF ACTION OF MICROPLUSIN, A COPPER II-CHELATING
 ANTIMICROBIAL PEPTIDE FROM THE CATTLE TICK *Rhipicephalus (Boophilus)*
MICROPLUS

Fernanda D. Silva¹, Carlos A. Rezende², Diego C. P. Rossi¹, Eliane Esteves¹, Fábio H. Dyszy³,
 Shirley Schreier⁴, Frederico Gueiros-Filho⁵, Cláudia Barbosa⁴, José R. Pires², Sirlei Daffre¹

From Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São
 Paulo, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil¹, Instituto de Bioquímica Médica, CCS,
 Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil²,

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CEP 05508-000,
 São Paulo, SP, Brazil³, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do

Paraíba, CEP 12244-000, São José dos Campos, SP, Brazil⁴

Running head: copper II chelating antimicrobial peptide

Address correspondence to: Sirlei Daffre, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508-900, São Paulo,
 SP, Brazil. Fax: 55 11 30917417; E-mail: sidaffre@ich.usp.br

⁵Both authors contributed equally to this work

Microplusin, a *Rhipicephalus (Boophilus)* *microplus* antimicrobial peptide (AMP) is the first fully characterized member of a new family of cysteine-rich AMPs with histidine-rich regions at the N- and C-termini. In the tick, microplusin belongs to the arsenal of innate defense molecules active against bacteria and fungi. Here we describe the NMR solution structure of microplusin and demonstrate that the protein binds copper II and iron II. Structured as a single α -helical globular domain, microplusin consists of five α -helices: α 1 (residues G9 to R21), α 2 (residues E27 to N40), α 3 (residues R44 to T54), α 4 (residues L57 to Y64) and α 5 (residues N67 to C80). The N- and C-termini are disordered. This structure is unlike any other AMP structures described to date. We also used NMR spectroscopy to map the copper binding region on microplusin. Finally, using the Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* as a model, we studied microplusin's mode of action. Microplusin has a bacteriostatic effect and does not permeabilize the bacterial membrane. Because microplusin binds metals, we tested whether this was related to its antimicrobial activity. We found that the bacteriostatic effect of microplusin was fully reversed by supplementation of culture media with copper II but not iron II. We also demonstrated that microplusin affects *M. luteus* respiration, a copper-dependent process. Thus, we conclude that the antibacterial effect of microplusin is

due to its ability to bind and sequester copper II.

INTRODUCTION

Antimicrobial peptides (AMPs) are widely distributed in nature and represent essential components of the first line of defense against infections. In mammals, AMPs are an important part of the innate immune system and may act either directly on microorganisms or by modulating the immune response (innate and adaptive) through (i) enhancement of phagocytosis, (ii) recruitment of immune cells to infection sites, (iii) induction of cytokines and (iv) neutralization of the septic effects of lipopolysaccharide. In invertebrates, which have only innate immunity, AMPs are extremely effective and work as powerful weapons against bacteria, fungi and protozoa (1-3).

AMPs are often short cationic molecules (12 to 100 amino-acids and with a net charge ranging between +2 and +10) with an amphipathic structure. Based on their structures, they are classified as linear, forming α -helices, or cysteine-containing β -sheet(s); they are also classified based on their richness in specific residues such as proline, glycine, tryptophan and histidine (1,4,5). In addition to cationic AMPs, there are some anionic AMPs with documented activity against a range of microorganisms (6-11).

Most information on such natural antibiotics relies on amphipathic cationic AMPs. In general,

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Developmental and Comparative Immunology 28 (2004) 191–200

Developmental
& Comparative
Immunology

www.elsevier.com/locate/devcompimm

Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile

Andréa C. Fogaça^a, Daniel M. Lorenzini^a, Luciana M. Kaku^a, Eliane Esteves^a,
Philippe Bulet^{b,1}, Sirlei Daffre^{a,*}

^aDepartamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374,
São Paulo 05508-900, Brazil

^bInstitute de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR 9022, CNRS, "Réponse Immunitaire et Développement chez les Insectes",
15, Rue René Descartes, Strasbourg 67084S, France

Received 30 April 2003; revised 8 July 2003; accepted 12 August 2003

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) are components of the immune system of both vertebrate and invertebrate animals. This study describes the isolation, primary structure, cDNA cloning, and tissue expression profile of two cysteine-rich AMPs from the hemolymph of the cattle tick *Boophilus microplus*. A 10,204 Da polypeptide, with six cysteine residues and no sequence similarity to any known molecule, was isolated from the cell-free hemolymph. Because of its sequence originality, this peptide was named microplusin. The second AMP was isolated from the hemocytes of *B. microplus*. This peptide, with a molecular mass of 4285 Da and six cysteines, is a defensin with similarity to the insect defensin family members. The cDNA cloning established that microplusin is synthesized as a prepeptide while the tick defensin is synthesized as a prepromolecule. Interestingly, despite the fact that microplusin and defensin have been isolated from different compartments, their gene expression was found to have similar tissue distribution.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Antimicrobial peptide; Cysteine-rich; Defensin; Immune system; Arthropod; Arachnid, tick

BMC GENOMICS (submitted)

Functional characterization of *Boophilus microplus* male salivary gland genes differentially expressed in response to *Anaplasma marginale* infection

Zorica Zivkovic^{1§}, Eliane Esteves², Consuelo Almazán³, Sirlei Daffre², Ard M. Nijhof¹, Frans Jongejan^{1, 4}, José de la Fuente^{5, 6}

¹Utrecht Centre for Tick-borne Diseases (UCTD), Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Yalelaan 1, 3584CL, Utrecht, The Netherlands.

²Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil.

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Km.5 carretera Victoria-Mante, CP 87000 Cd. Victoria, Tamaulipas, Mexico.

⁴Department of Veterinary Tropical Diseases, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, Private Bag X04, 0110, Onderstepoort, South Africa

⁵Department of Veterinary Pathobiology, Center for Veterinary Health Sciences, Oklahoma State University, Stillwater, OK 74078, USA.

⁶Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Ronda de Toledo s/n, 13005 Ciudad Real, Spain.

§Corresponding author

Note: Sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Library under accession numbers XXXXX-XXXXX

Email addresses:

ZZ: Z.Zivkovic@uu.nl

EE: eliane.esteves@gmail.com

CA: consuelo_almazan@yahoo.com.mx

SD: sidaffre@icb.usp.br

AN: A.Nijhof@uu.nl

FJ: f.jongejan@uu.nl

JF: jose_delafuente@yahoo.com

Abstract

The cattle tick, *Boophilus microplus*, is considered to be the main vector of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tropical and subtropical regions. *Anaplasma marginale*, the causative agent of bovine anaplasmosis undergoes a complex developmental cycle in tick tissues before final invasion of salivary glands, which is an essential step towards transmission to the mammalian host. In previous studies, we showed that *A. marginale* modifies gene expression in *Dermacentor variabilis* and cultured IDE8 tick cells. Herein, a functional genomics approach was used to identify and characterize *B. microplus* salivary gland genes which are differentially expressed in response to *A. marginale* infection. Additionally, the *B. microplus*-derived BME26 cell line was used for the first time to study *A. marginale*-tick interactions.

BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH (submetido)

Induction of Gloverin-like polypeptide in the Sugarcane Borer *Diatraea saccharalis* challenged by Septic Injury

J. L. da C. Silva¹, J. F. Barbosa¹, J. P. Bravo¹, E. M. de Souza², L. F. Huergo², F. de O. Pedrosa², E. Esteves³, S. Daffre³ and M. A. Fernandez¹

¹Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

³Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Corresponding author:

Maria Aparecida Fernandez

Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá

Av. Colombo, 5790 - 87020-900 – Maringá, Paraná, Brasil

Phone: 55 (44) 3261 1314; Fax: 55 (44) 3261 48 93

E-mail address: aparecidafernandez@gmail.com

Running title: gloverin-like polypeptide in *D. saccharalis*

Key words: *Diatraea saccharalis*; Lepidoptera; Immune response; Gloverin; Sugarcane borer; Hemolymph

Abstract

Diatraea saccharalis (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) is an important pest in the Brazilian sugarcane crop. In this work, we evidenced two distinct spots (named HDs 1 and HDs2) separated by 2DE gel electrophoresis in hemolymph from septic injured larva. Both spots were subjected to in-gel tryptic digestion, and MALDI-TOF/TOF analysis, which revealed the sequence VFGTLGSDDSGFLFGK present in both HDs1 and HDs2. This sequence had 80% identity with specific Lepidoptera antimicrobial peptides called gloverins. Antimicrobial assays with partially purified fractions containing the HDs1 and HDs2 polypeptides demonstrated activity against *Escherichia coli*. This is the first report of antimicrobial polypeptides in *D. saccharalis*, and the identification of these peptides may help in the generation of new strategies to control this pest.