

LARISSA ALMEIDA MARTINS

**Determinação do proteoma diferencial de células de carrapato em resposta à infecção por *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa**

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  
2018

LARISSA ALMEIDA MARTINS

**Determinação do proteoma diferencial de células de carrapato em resposta à infecção por *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa**

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: Profa. Dra. Andréa Cristina Fogaça

Versão original

São Paulo  
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Almeida Martins, Larissa

DETERMINAÇÃO DO PROTEOMA DIFERENCIAL DE CÉLULAS  
DE CARRAPATO EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Rickettsia*  
*rickettsii*, AGENTE ETIOLÓGICO DA FEBRE MACULOSA. /  
Larissa Almeida Martins; orientadora Andréa  
Cristina Fogaça. -- São Paulo, 2018.

130 p.

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

1. carrapato. 2. *Rickettsia*. 3. proteoma. 4.  
cultivo celular. 5. apoptose. I. Fogaça, Andréa  
Cristina, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidata: **Larissa Almeida Martins**

Título da Tese: **Determinação do proteoma diferencial de células de carrapato em resposta à infecção por *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa**

Orientadora: **Profa. Dra. Andréa Cristina Fogaça**

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

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.014/2014.

## DECLARAÇÃO

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

São Paulo, 19 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

Aos meus pais Almir e Elaine, por todo apoio, suporte e incentivo em seguir meus sonhos e meus estudos. É impossível descrever minha gratidão por vocês, são os melhores pais. Sem vocês ao meu lado não teria superado os desafios dessa jornada.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Andréa Cristina Fogaça, muito obrigada por sua dedicação e confiança, até mesmo no período em que enfrentamos dificuldades você não desistiu de mim. Agradeço imensamente todo aprendizado, orientação e por me proporcionar crescimento e amadurecimento pessoal e profissional, desde o mestrado, o que sinto por você é um grande apreço e muita gratidão.

À Profa. Dra. Sirlei Daffre por todo o apoio, colaboração, as críticas construtivas e as discussões, muito obrigada por estar sempre presente durante essa caminhada.

Agradeço de forma especial a Profa. Dra. Tania Bijovsky por ter me ajudado a superar barreiras e estar ao meu lado em todos os momentos. Obrigada pelo incentivo, cuidado e os puxões de orelha, que sempre foram essenciais.

Às pós-doutorandas que posso chamar de amigas: Dra. Maria Fernanda Bandeira de Melo Galletti que mesmo longe ainda está perto, obrigada por ser essa pessoa mais que especial, por todos os ensinamentos e paciência; a Dra. Eliane Esteves agradeço todos os dias por poder contar com você (Eli...obrigada por ter sido a luz no fim do túnel com as riquétias, sou eternamente grata); a Dra. Adne Abud Righi por me passar tranquilidade sempre. Agradeço imensamente todo o carinho, colaboração e a amizade que vocês dedicaram a mim, vocês são meus exemplos de força, caráter e profissionalismo.

Aos colaboradores desse projeto: Prof. Dr. Giuseppe Palmisano e Dra. Rebeca Kawahara pelas análises de LC-MS/MS, Dr. Mario Balanco pela ajuda com as análises de apoptose, ao Prof. Dr. Mauro Cortez com a microscopia de fluorescência e ao Prof. Dr. André Fujita com as análises estatísticas.

A todos do Laboratório de Bioquímica e Imunologia de Artrópodes em especial aos “jovens padawans”: Beatriz Alonso, Lucas Godoi, Thales Kaida, Marcellly Nassar e Gisele Araújo, obrigada por me ensinarem a ensinar! Ao novo amigo pós-doutorando Dr. Daniel Pavanelo e a pós-doutoranda Flávia Viana. As técnicas do laboratório em especial a Claudia Angeli que sempre ajudou para que não nos faltasse nada dentro do laboratório. Assim como agradeço aqueles que

estiveram de passagem pelo laboratório e que tive a oportunidade de conviver e aprender muito: Kerstin Creutzberg, Dr. Philippe Bulet, Ms. Carol Colonia, Ms. Matěj Kučera e Nicolas Schröder.

A meus grandes amigos-família que tive a oportunidade de encontrar já nos primeiros anos de ICB e que estão ao meu lado em todos os momentos: André Cardoso, Ceres Maciel, Rafaella Ioshino, André Luis da Costa-da-Silva, Alexandre Moura e Michele Barros, amo vocês! Assim como os melhores amigos Eliana Cubillos, Isadora Prata, Marcell Crispim...obrigada por estarem comigo e deixarem a vida mais leve e alegre sempre.

A todos os docentes e funcionários do departamento de Parasitologia, pelo convívio e por sempre me auxiliarem quando precisei.

Muito obrigada a todos, por tudo que me ensinaram e me ajudaram, a convivência com cada um de vocês contribuiu para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a DEUS que me permitiu realizar este trabalho e me deu força a cada dia para continuar, e sei que Ele colocou pessoas tão especiais em meu caminho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida 2014/05855-7 e a CNPq pelo auxílio financeiro.





“Vivemos em uma sociedade primorosamente dependente de ciência e tecnologia,  
na qual quase ninguém sabe nada sobre ciência e tecnologia.”

**Carl Sagan**

## RESUMO

MARTINS, L.A. **Determinação do proteoma diferencial de células de carrapato em resposta à infecção por *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa.** [tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

A febre maculosa das Montanhas Rochosas, conhecida no Brasil como febre maculosa brasileira (FMB), é a riquetsiose mais grave que acomete o homem. A doença é causada por *Rickettsia rickettsii*, uma  $\alpha$ -proteobactéria intracelular obrigatória transmitida pela picada de diferentes espécies de carrapatos. Apesar das altas taxas de letalidade da FMB, sua profilaxia baseia-se exclusivamente na prática de se evitar o contato com os carrapatos vetores. Neste contexto, a identificação e caracterização das proteínas envolvidas nas interações entre *R. rickettsii* e carrapatos é importante, podendo auxiliar na identificação de potenciais alvos para o controle da doença. Para isso, o uso de um sistema *in vitro* (linhagem celular) é fundamental, pois permite que análises sejam realizadas ao longo da infecção e com um maior controle das condições experimentais que os experimentos *in vivo*, além de não envolver o uso de animais vertebrados. Assim, o objetivo geral desse projeto de pesquisa foi identificar o conjunto de proteínas (proteoma) de células do carrapato *Rhipicephalus microplus* (linhagem BME26) infectadas ou não por *R. rickettsii*. As proteínas extraídas de células BME26 em um ponto inicial da (6 h) e na fase exponencial de crescimento bacteriano (48 h) foram processadas e analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas *in tandem* (LC-MS/MS). Como controle, as proteínas extraídas de células não infectadas nos pontos de 6 e 48 h foram igualmente processadas e analisadas. Um total de 1.119 proteínas foram identificadas, das quais 1.111 correspondem a proteínas de carrapatos e apenas oito a proteínas de bactérias, as quais foram desconsideradas das análises subsequentes. Após 6 h de infecção, 163 proteínas de foram induzidas e 159 foram reprimidas. Em 48 h, 95 proteínas foram induzidas e 65 foram reprimidas. Dentre as proteínas moduladas em resposta à infecção por *R. rickettsii*, proteínas de regulação negativa de apoptose foram reprimidas no ponto de 6 h e induzidas no ponto de 48 h. A apoptose é um processo de morte celular

programada, o qual é ativado por diferentes estímulos, inclusive por infecções. Após o reconhecimento do estímulo, uma série de fatores são ativados, incluindo as enzimas-chave do processo, denominadas caspases, culminando na morte celular. Como o sistema imune de artrópode é mais simples que o sistema imune de vertebrados, a apoptose é um mecanismo importante de controle das infecções. Dessa forma, avaliamos a fragmentação de DNA genômico (DNAg) e a exposição de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática, duas características típicas de células em apoptose, e a atividade de caspase 3 em células BME26 infectadas ou não por *R. rickettsii*. A fragmentação de DNAg foi observado apenas nas células não infectadas após 96 h. Além disso, a atividade da caspase-3 foi significativamente menor em células infectadas em relação ao controle. Em contrapartida, a inibição da atividade da caspase-3 não foi observada quando as células foram estimuladas com riquetsias termo-inativadas, sugerindo que fatores produzidos por *R. rickettsii* sejam necessários para esse efeito. A exposição de fosfatidilserina também foi pronunciadamente maior em células infectadas do que em células não infectadas ou estimuladas com bactérias termo-inativadas. A inibição química da apoptose com Z-DEVD-Fmk, inibidor de caspase-3, favoreceu o crescimento de *R. rickettsii* em células BME26. Por outro lado, o tratamento com estaurosporina, um ativador clássico da apoptose, inibiu o crescimento bacteriano. Em conjunto, os dados mostram que o processo de apoptose em células BME26 é controlado por *R. rickettsii*, o que é importante para a sua proliferação. Esse é o primeiro relato sobre a inibição da apoptose em células de carrapatos por bactérias do gênero *Rickettsia*. Estudos futuros deverão ser realizados para identificar as proteínas de *R. rickettsii*, bem como de seus carrapatos vetores, envolvidas no controle da apoptose, podendo auxiliar numa melhor compreensão da interação vetor-patógeno.

**Palavras-chave:** Carrapato. *Rickettsia*. Proteoma. Cultivo celular. Apoptose.

## ABSTRACT

MARTINS, L.A. **Determination of the tick cells proteome in response to *Rickettsia rickettsii* infection, the etiologic agent of spotted fever.** [Ph.D thesis (Biology of Host-Pathogen Interactions)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

Rocky Mountain spotted fever, known in Brazil as Brazilian spotted fever (FMB), is the most severe rickettsial disease that affects humans. The disease is caused by *Rickettsia rickettsii*, an obligate intracellular  $\alpha$ -proteobacterium transmitted by the bite of different species of ticks. Despite the high rates of FMB lethality, its prophylaxis is based exclusively on the practice of avoiding contact with the vector ticks. In this context, the identification and characterization of the proteins involved in the interactions between *R. rickettsii* and ticks is important and may help to identify potential targets for disease control. To this end, the use of an in vitro system (cell line) is fundamental because it allows that analyzes can be carried out throughout the infection and with a greater control of the experimental conditions than the in vivo experiments, besides not involving the use of vertebrate animals. Thus, the general objective of this research project was to identify the protein (proteome) of *Rhipicephalus microplus* tick cells (BME26 line) infected or not by *R. rickettsii*. Proteins extracted from BME26 cells at a starting point of infection (6 h) and in the exponential phase of bacterial growth (48 h) were processed and analyzed by liquid chromatography coupled to in-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). As a control, proteins extracted from uninfected cells at 6 and 48 h were also processed and analyzed. A total of 1,119 proteins were identified, of which 1,111 corresponded to tick proteins and only eight to bacterial proteins, which were discarded from subsequent analyzes. After 6 h of infection, 163 proteins were upregulated and 159 were downregulated. In 48 h, 95 proteins were upregulated and 65 were downregulated. Among the proteins modulated in response to *R. rickettsii* infection, apoptosis negative regulatory proteins were downregulated at the 6 h point and upregulated at the 48 h point. Apoptosis is a programmed cell death process, which is activated by different stimuli, including infections. After the stimulus recognition, a number of factors are activated, including the key enzymes of process, called

caspses, culminating in cell death. As the arthropod immune system is simpler than the vertebrate immune system, apoptosis is an important mechanism of infection control. Therefore, we evaluated the fragmentation of genomic DNA (DNAg) and the phosphatidylserine exposure on the outer surface of the plasma membrane, two typical characteristics of cells in apoptosis, as well as the activity of caspase 3, in BME26 cells infected or not by *R. rickettsii*. DNAg fragmentation was observed only in uninfected cells after 96 h. In addition, caspase-3 activity was significantly lower in infected cells than in control cells. In contrast, inhibition of the caspase-3 activity was not observed when cells were stimulated with heat-killed rickettsiae, suggesting that factors produced by *R. rickettsii* are required for such effect. Phosphatidylserine exposure was also markedly higher in infected cells than in uninfected or in cells stimulated with heat-killed bacteria. Chemical inhibition of apoptosis with Z-DEVD-Fmk, a caspase-3 inhibitor, favored the growth of *R. rickettsii* in BME cells<sup>26</sup>. On the other hand, staurosporin treatment, a classic activator of apoptosis, inhibited bacterial growth. Taken together, these data show that the process of apoptosis in BME26 cells is controlled by *R. rickettsii*, which is important for its proliferation. This is the first report on the inhibition of apoptosis in tick cells by bacteria of the genus *Rickettsia*. Future studies should be carried out to identify the rickettsial proteins, as well as their vector ticks, involved in the control of apoptosis, and may help to better understand the vector-pathogen interaction.

**Keywords:** Tick. Rickettsia. Proteoma. Cell culture. Apoptosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Via intrínseca e via extrínseca de ativação da apoptose.....	32
<b>Figura 2.</b> Curva de crescimento de <i>R. rickettsii</i> em células BME26.....	51
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografia de células BME26 infectadas por <i>R. rickettsii</i> .....	52
<b>Figura 4.</b> Curva de crescimento de <i>R. rickettsii</i> em células endoteliais humanas HMEC-1.....	53
<b>Figura 5.</b> Perfis cromatográficos dos peptídeos resultantes do tratamento de proteínas extraídas de células BME26 (fragmentos trípticos) infectadas ou não por <i>R. rickettsii</i> por LC-MS/MS.....	54
<b>Figura 6.</b> PCA dos proteomas de células BME26 não infectadas (controle) ou infectadas por <i>R. rickettsii</i> .....	55
<b>Figura 7.</b> Número total de proteínas de carrapatos identificadas por LC-MS/MS em células BME26 não infectadas (controle) ou infectadas por <i>R. rickettsii</i> por 6 h e 48 h.....	56
<b>Figura 8.</b> Número de proteínas de células BME26 identificadas por LC-MS/MS e moduladas por <i>R. rickettsii</i> após 6 h de infecção.....	57
<b>Figura 9.</b> Número de proteínas de células BME26 identificadas por LC-MS/MS e moduladas por <i>R. rickettsii</i> após 48 h de infecção.....	58
<b>Figura 10.</b> Classificação funcional de proteínas de células BME26 induzidas e reprimidas pela infecção por <i>R. rickettsii</i> nos pontos de 6 e 48 h.....	60
<b>Figura 11.</b> Avaliação do silenciamento e quantificação de <i>R. rickettsii</i> em células BME26 tratadas com dsRNAs de proteínas moduladas pela infecção.....	65
<b>Figura 12.</b> Avaliação de DNAg de células BME26 não infectadas (controle) e após 6, 24, 48, 72, 96 e 120 h da infecção por <i>R. rickettsii</i> por eletroforese em gel de agarose.....	66
<b>Figura 13.</b> Efeitos de diferentes concentrações de estaurosporina sobre a viabilidade de células BME26.....	66

<b>Figura 14.</b> Avaliação da atividade de caspase-3 em células BME26 em resposta ao tratamento com diferentes concentrações de estaurosporina.....	67
<b>Figura 15.</b> Avaliação da atividade de caspase-3 em células BME26 não infectadas ou previamente infectadas por diferentes tempos com <i>R. rickettsii</i> .....	68
<b>Figura 16.</b> Avaliação da eficiência da termo-inativação de <i>R. rickettsii</i> através do monitoramento do crescimento bacteriano em células BME26 por qPCR.....	69
<b>Figura 17.</b> Avaliação da atividade de caspase-3 em células BME26 não infectadas ou inoculadas por 48 h com <i>R. rickettsii</i> viáveis ou termo-inativadas.....	70
<b>Figura 18.</b> Avaliação da exposição de fofatidilserina em células BME26 não infectadas ou estimuladas por 48 h com <i>R. rickettsii</i> viáveis ou termo-inativadas por microscopia de fluorescência.....	71
<b>Figura 19.</b> Efeitos de diferentes concentrações de inibidor de caspase-3 (Z-DEVD-Fmk) sobre a viabilidade de células BME26.....	72
<b>Figura 20.</b> Avaliação da atividade de caspase-3 em células BME26 tratadas com diferentes concentrações de inibidor Z-DEVD-Fmk.....	73
<b>Figura 21.</b> Curva de crescimento de <i>R. rickettsii</i> em células BME26 na presença ou na ausência de estaurosporina ou de inibidor Z-DEVD-Fmk.....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Casos autóctones confirmados de FMB no Estado de São Paulo segundo evolução final e ano de início dos sintomas (dados de 2007 a 2018*).....	26
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos específicos para as CDSs de proteínas moduladas pela infecção para as análises por RT-qPCR e para o silenciamento gênico por RNAi...	43
<b>Tabela 3.</b> Seleção de proteínas de células BME26 que foram induzidas após 6 e 48 h da infecção por <i>R. rickettsii</i> .....	61
<b>Tabela 4.</b> Seleção de proteínas de células BME26 que foram reprimidas após 6 e 48 h da infecção por <i>R. rickettsii</i> .....	62
<b>Tabela 5.</b> CDSs de proteínas selecionadas para o silenciamento por RNAi.....	64



## LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

<b>Tabela suplementar 1.</b> Proteínas diferencialmente expressas nas células BME26 após 6 h de infecção com <i>R. rickettsii</i> .....	111
<b>Tabela suplementar 2.</b> Proteínas exclusivamente identificadas em células BME26 não infectadas (controle) no tempo de 6 h.....	116
<b>Tabela suplementar 3.</b> Proteínas exclusivamente identificadas em células BME26 infectadas por <i>R. rickettsii</i> no tempo de 6 h.....	119
<b>Tabela suplementar 4.</b> Proteínas diferencialmente expressas nas células BME26 após 48 h de infecção com <i>R. rickettsii</i> .....	123
<b>Tabela suplementar 5.</b> Proteínas exclusivamente identificadas em células BME26 não infectadas (controle) no tempo de 48 h.....	125
<b>Tabela suplementar 6.</b> Proteínas exclusivamente identificadas em células BME26 infectadas por <i>R. rickettsii</i> no tempo de 48 h.....	127
<b>Tabela suplementar 7.</b> Proteínas de <i>Rickettsia</i> identificadas no proteoma de células BME26 infectadas.....	130

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs - absorbância

AMC - 7-amino-4-metil cumarínico

Apaf-1 - fator ativador de protease apoptótica-1

ATCC - American type culture collection

BCA - ácido bicinconínico

BME26 - linhagem celular embrionária do carrapato *Rhipicephalus microplus*

cDNA - ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar

CDS - sequência codificadora

CHAPS - 3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-1-propanossulfonato

CID - dissociação induzida por colisão

Cq - *cycle quantification* (ciclo de quantificação)

DAP-1 - *Death-associated protein* (Proteína associada à morte)

DIAP-1 - proteína 1 de inibição de apoptose de *Drosophila*

DISC - death-inducing signaling complex (complexo de sinalização indutor de morte)

DMSO - dimetil sulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNAg - DNA genômico

dNTP - didesoxirribonucleotídeo trifosfatado

dsRNA - ácido ribonucleico (RNA) dupla fita

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiamino tetracético

ERO - espécie reativa de oxigênio

Fas - fatty acid synthetase (ácido graxo sintetase)

FADD - Fas associated death domain (Fas associado ao domínio de morte)

FDR - *false discovery rate* (taxa de falsa descoberta)

FMB - febre maculosa brasileira

GFP - *Green fluorescent protein* (proteína fluorescente verde)

*gltA* - gene codificador da citrato sintase

HMEC-1 - human microvascular endothelial cells line 1 (linhagem de células endoteliais microvasculares humanas)

HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico

IAA - iodoacetamida

IAP - inibidor de apoptose

IRE/CTVM20 - linhagem celular embrionária do carrapato *Ixodes ricinus*

ISE6 - linhagem celular embrionária do carrapato *Ixodes scapularis*

LC - liquid chromatography (cromatografia líquida)

LC-MS/MS - LC- tandem mass spectrometry (LC acoplada a espectrometria de massas *in tandem*)

LFQ - *label-free quantification* (quantificação livre de marcadores)

MOI - *multiplicity of infection* (multiplicidade de infecção)

MTT - sal tetrazólico

MVGS - suplemento de crescimento microvascular

NF- $\kappa$ B - fator nuclear kappa B

PAM - peptídeo antimicrobiano

PBS - tampão fosfato salino

PCA - principal component analysis (análise de componentes principais)

PCR - reação em cadeia da polimerase

pH - potencial hidrogeniônico

PI - iodeto de propídeo

PIPES - piperazina-N,N'-bis[ácido 2-etanossulfônico]

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil

qPCR - PCR quantitativa

RIFI - reação de imunofluorescência indireta

RMSF - *Rocky Mountain spotted fever* (febre maculosa das Montanhas Rochosas)

RNA - ácido ribonucleico

RNAi - RNA de interferência

RNA-seq - sequenciamento de RNA de última geração em larga escala

RPM - rotações por minuto

RT - transcrição reversa

RT-qPCR - qPCR precedida por RT

SFB - soro fetal bovino

SMAC - *second mitochondrial activator of caspases* (segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria)

SPG - tampão sacarose-glutamato-potássio

TBE - tampão tris-borato-EDTA

TBEV - vírus da encefalite transmitida por carrapatos

TFA - ácido trifluoroacético

TRIS - Tris (hidroximetilaminometano)

UAF - unidade arbitrária de fluorescência

UV - ultravioleta

## LISTAS DE SÍMBOLOS E UNIDADES

°C - grau Celsius

µg - micrograma

µL - microlitro

µm - micrômetro

cm<sup>2</sup> - centímetro quadrado

g - grama

h - hora

L - litro

M - molar

min - minuto

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - millimolar

ng - nanograma

nL - nanolitro

nm - nanômetro

nM - nanomolar

p/v - peso por volume

pb - pares de bases

s - segundo

U - unidade

V - volt

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	24
1.1. Febre maculosa das Montanhas Rochosas: aspectos gerais .....	24
1.2. Estudos da interação <i>R. rickettsii</i> -carrapatos vetores .....	26
1.3. Cultivos celulares como modelos para estudo da relação patógeno- vetor	28
1.4. A apoptose como um mecanismo de defesa contra patógenos .....	31
2. OBJETIVOS .....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
3.1. Cultivo de células .....	38
3.2. <i>R. rickettsii</i> .....	38
3.3. Infecção experimental de células <i>in vitro</i> .....	39
3.4. Extração de ácidos nucleicos .....	40
3.5. Determinação dos níveis de infecção de <i>R. rickettsii</i> por PCR quantitativa (qPCR) .....	40
3.6. Análise de proteínas por LC-MS/MS .....	41
3.7. Silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) .....	43
3.7.1. Desenho e síntese de oligonucleotídeos .....	43
3.7.2. Síntese de cDNA .....	44
3.7.3. Teste dos oligonucleotídeos por PCR convencional .....	44
3.7.4. Determinação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos por RT-qPCR .....	45
3.7.5. Síntese de dsRNA .....	45
3.7.6. Tratamento das células com dsRNA .....	46
3.7.7. Avaliação do silenciamento gênico por RT-qPCR .....	46
3.7.8. Avaliação dos efeitos do silenciamento gênico na proliferação de <i>R. rickettsii</i> .....	47
3.8. Avaliação de morte celular por apoptose .....	47
3.8.1. Avaliação de fragmentação de DNAg por eletroforese em gel de agarose .....	47
3.8.2. Ensaio de Citotoxicidade .....	47
3.8.3. Ensaio enzimático para avaliação da atividade de caspase-3 .....	48
3.8.4. Avaliação de apoptose por microscopia de fluorescência .....	50
3.8.5. Avaliação dos efeitos da apoptose na proliferação de <i>R. rickettsii</i> em células BME26 .....	50
4. RESULTADOS .....	51

4.1. Avaliação da infecção de linhagens celulares pela cepa Taiacu de <i>R. rickettsii</i> .....	51
4.2. Proteoma diferencial de células BME26 infectadas por <i>R. rickettsii</i> .....	53
4.3. Determinação dos efeitos do silenciamento das CDSs de proteínas moduladas pela infecção sobre a proliferação de <i>R. rickettsii</i> em células BME26 .....	63
4.4. Avaliação da apoptose em células BME26 frente a infecção por <i>R. rickettsii</i> .....	65
4.5. Efeito da apoptose sobre a proliferação de <i>R. rickettsii</i> em células BME2672	
5. DISCUSSÃO .....	75
6. CONCLUSÃO .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Febre maculosa das Montanhas Rochosas: aspectos gerais

A febre maculosa das Montanhas Rochosas (*Rock Mountain spotted fever*, RMSF), conhecida no Brasil como febre maculosa brasileira (FMB), é a mais grave rickettsiose que acomete o homem (Dantas-Torres, 2007; Labruna, 2009). O agente etiológico da doença, a bactéria *Rickettsia rickettsii*, está restrita ao continente americano, onde se encontra amplamente distribuído, com casos reportados no Canadá, Estados Unidos (Chapman et al., 2006), México (Zavala-Castro et al., 2006), Costa Rica (Fuentes, 1986; Hun, Cortés e Taylor, 2008), Panamá (Estripeaut et al., 2007), Colômbia (Hidalgo et al., 2007), Argentina (Ripoll et al., 1999; Paddock et al., 2008) e Brasil (Angerami et al., 2006; Galvão et al., 2002; de Lemos, Rozental e Villela, 2002).

A transmissão de *R. rickettsii* é dada pela picada de diferentes espécies de carrapatos (filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida) (Dantas-Torres, Chomel e Otranto, 2012). Nos EUA, as espécies *Dermacentor variabilis* e *Dermacentor andersoni* são as principais transmissoras. No estado da Carolina do Norte, o carrapato *Amblyomma americanum* também foi incriminado como vetor, enquanto em uma região restrita do estado do Arizona, e também no México, *Rhipicephalus sanguineus* transmite a bactéria (Dantas-Torres, Chomel e Otranto, 2012). Espécies do complexo *Amblyomma cajennense* (Nava et al., 2014) são transmissoras na América Central e na América do Sul, incluindo o Brasil, onde *Amblyomma sculptum* é o principal vetor (Labruna, 2009). Na região metropolitana do estado de São Paulo, *Amblyomma aureolatum* também é reconhecido como vetor, enquanto *R. sanguineus* é considerado um vetor potencial (Labruna, 2009; Dantas-Torres, Chomel e Otranto, 2012).

A bactéria *R. rickettsii*, que é inoculada juntamente com a saliva durante o repasto sanguíneo do carrapato, coloniza as células endoteliais dos vasos sanguíneos que irrigam diferentes órgãos do hospedeiro. A infecção das células endoteliais desencadeia vasculite, a qual pode ser fatal, principalmente quando atinge órgãos como cérebro, coração, rins e pulmões (Walker, Valbuena e Olano,



2003). A antibioticoterapia para o tratamento da doença é efetiva, porém apenas quando iniciada precocemente, ao surgimento das primeiras manifestações da doença. No entanto, tais manifestações, que incluem febre, cefaleia e mialgia, são muito semelhantes às de enfermidades causadas por vírus, tais como gripe e dengue, ou por outras bactérias, dificultando o diagnóstico clínico (Chen e Sexton, 2008; Raoult e Roux, 1997). O diagnóstico laboratorial recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) é a imunofluorescência indireta (RIFI), um teste sorológico no qual anticorpos reagem com antígenos específicos de riquetsias. No entanto, esses anticorpos não são detectáveis em menos de 10 a 12 dias de infecção, o que também limita o diagnóstico precoce da doença (Chen e Sexton, 2008).

Em decorrência de seu diagnóstico tardio, as taxas de letalidade da FMB são altas, podendo ultrapassar os 70%. A maior incidência da doença ocorre na região sudeste, justamente a mais populosa do país (Ministério da Saúde - <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/fevereiro/02/Casos-confirmados-febre-maculosa.pdf>). Somente no estado de São Paulo, 818 casos ao longo de pelo menos 116 municípios foram confirmados laboratorialmente de 2007 a 2018, dos quais 419 evoluíram a óbito [**Tabela 1**; Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo - <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/zoonoses/febre-maculosa/dados-estatisticos>].

Apesar da severidade e das altas taxas de letalidade da doença, ainda hoje sua profilaxia baseia-se exclusivamente na prática de se evitar o contato com os carrapatos vetores (Dantas-Torres, 2007). Nesse contexto, entender os mecanismos moleculares da interação de *R. rickettsii* com seus carrapatos vetores é importante, podendo auxiliar na identificação de potenciais alvos para o desenvolvimento de estratégias tanto para o controle de carrapatos quanto para o bloqueio da transmissão dessa bactéria.

**Tabela 1. Casos autóctones confirmados de FMB no Estado de São Paulo segundo evolução final e ano de início dos sintomas (dados de 2007 a 2018\*).**

<b>Ano Inic.Sintomas</b>	<b>Ign/Branco</b>	<b>Cura</b>	<b>Óbito por FMB</b>	<b>Letalidade</b>	<b>Óbito por outra causa</b>	<b>Total</b>
2007	1	23	12	34,3	0	36
2008	2	30	16	34,8	0	48
2009	2	44	27	38,0	0	73
2010	0	40	26	39,4	2	68
2011	2	36	42	53,8	0	80
2012	1	31	47	60,3	0	79
2013	2	25	34	57,6	1	62
2014	1	21	58	73,4	3	83
2015	2	36	64	64,0	1	103
2016	0	31	39	55,7	0	70
2017	4	34	36	51,4	2	76
2018	0	22	18	45,0	0	40
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>373</b>	<b>419</b>	<b>52,9</b>	<b>9</b>	<b>818</b>

Fonte: SINAN-NET

\*dados provisórios até 09/08/2018

## **1.2. Estudos da interação *R. rickettsii*-carrapatos vetores**

Embora esteja restrita às células endoteliais no hospedeiro vertebrado, *R. rickettsii* infecta todos os tecidos dos seus carrapatos vetores. Primeiramente, as bactérias, ingeridas em conjunto com a alimentação sanguínea, coloniza o intestino. Do intestino, migra, via hemolinfa para os demais tecidos, incluindo as glândulas salivares, das quais pode ser transmitida para outro hospedeiro vertebrado durante um repasto sanguíneo subsequente (Dantas-Torres, 2007). Como também coloniza os ovários, a transmissão de *R. rickettsii* pode ser transovariana, além de transestadial (Burgdorfer e Brinton, 1975) e interestadial (Azad e Beard, 1998), de forma que os carrapatos, além de vetores, são reservatórios da bactéria (Burgdorfer e Brinton, 1975; Labruna, 2009). No entanto, as diferentes formas de transmissão parecem não ser suficientes para manter altas taxas de prevalência da bactéria nas populações naturais de carrapatos, que oscilam em torno de 1,5% (Guedes et al., 2005; Pinter e Labruna, 2006; Horta et al., 2007). Essa baixa prevalência de carrapatos infectados parece estar associada a menores taxas reprodutivas e de sobrevivência de linhagens infectadas (Labruna et al., 2008; Soares et al., 2012; Niebylski, Peacock e Schwan, 1999; Burgdorfer e Brinton, 1975), sugerindo que *R. rickettsii* seja patogênica também para seus vetores.

Apesar de *A. sculptum* e *A. aureolatum* serem importantes vetores de *R. rickettsii* no Brasil, essas duas espécies exibem diferenças marcantes em relação à susceptibilidade à infecção. Após infecções experimentais em laboratório, a prevalência de carrapatos *A. aureolatum* infectados varia de 80-100%, enquanto em *A. sculptum*, oscila entre 1-10% (Labruna et al., 2008). Em um estudo posterior, observou-se que se *R. rickettsii* consegue colonizar o intestino de carrapatos *A. sculptum* e *A. aureolatum*, as glândulas salivares também são colonizadas (Martins et al., 2017). Ou seja, não foram observados carrapatos com infecção restrita ao intestino, sugerindo que esse órgão contenha fatores importantes para o controle da infecção. Os transcriptomas do intestino de carrapatos infectados e não infectados, determinados por sequenciamento de RNA de última geração em larga escala (RNA-seq), mostraram que a maioria das sequências codificadoras (CDSs) de *A. sculptum* diferencialmente expressas pela infecção foi induzida, enquanto as CDSs de *A. aureolatum* foram majoritariamente reprimidas. Dentre as principais classes funcionais que compreendem as CDSs reguladas diferencialmente estão componentes do sistema imune. Assim, é muito provável que as diferentes respostas transcricionais do intestino dessas duas espécies de carrapatos estejam relacionadas às suas diferenças de susceptibilidade à infecção (Martins et al., 2017).

A determinação da expressão gênica de um patógeno durante a infecção do vetor ou hospedeiro vertebrado também pode fornecer informações importantes para um melhor entendimento da relação vetor-patógeno-hospedeiro e, portanto, vem sendo empregada para o estudo de uma grande diversidade de microrganismos (La, Raoult e Renesto, 2008). Dessa forma, nosso grupo de pesquisa determinou o perfil transcricional de *R. rickettsii* infectando órgãos de fêmeas adultas de *A. aureolatum* submetidas a uma elevação da temperatura ou à alimentação sanguínea por microarranjos de oligonucleotídeos (Galletti et al., 2013). Estudos anteriores haviam sugerido que esses dois fatores fossem importantes para à reativação da virulência da bactéria em carrapatos (Gilford e Price, 1955; Spencer e Parker, 1923), porém os mecanismos moleculares responsáveis por esse fenômeno não haviam sido elucidados. De maneira geral, nossos resultados

mostraram que a aquisição da alimentação sanguínea pelo vetor modula um número cinco vezes maior de genes do que a elevação da temperatura em 10°C. A expressão de fatores de virulência bacterianos foi induzida pela alimentação sanguínea, dentre eles componentes do sistema de secreção do tipo IV (T4SS). Bactérias Gram-negativas utilizam o T4SS para conduzir efetores (DNA e proteínas) para a célula hospedeira, onde desempenham diferentes funções, evitando sua eliminação e garantindo a replicação (Alvarez-Martinez e Christie, 2009; Voth, Broederdorf e Graham, 2012). Além dos genes codificadores de componentes do T4SS, também foi observada a modulação de enzimas antioxidantes, que podem refletir a tentativa de *R. rickettsii* se proteger dos efeitos de radicais livres possivelmente produzidos no intestino dos carrapatos alimentados (Graça-Souza et al., 2006). Em um trabalho subsequente, demonstrou-se que a elevação da temperatura em 10°C modula um número maior de genes bacterianos nas glândulas salivares, enquanto a alimentação sanguínea ocasiona maiores efeitos na expressão gênica de bactérias colonizando o intestino (Galletti et al., 2016). Como o intestino é o primeiro sítio de replicação bacteriana nos carrapatos, é possível que os genes de *R. rickettsii* induzidos pela alimentação sanguínea nesse órgão estejam envolvidos na colonização do vetor. Por outro lado, a elevação da temperatura parece ser importante para ativar genes da bactéria infectando as glândulas salivares, preparando a *R. rickettsii* para ser transmitida para o hospedeiro vertebrado (Galletti et al., 2016).

### **1.3. Cultivos celulares como modelos para estudo da relação patógeno-vetor**

O desenvolvimento de sistemas de cultivo de células *in vitro*, particularmente de linhagens celulares contínuas derivadas de tecidos de artrópodes vetores, vem contribuindo de maneira significativa para os estudos da relação patógeno-vetor. As primeiras linhagens celulares contínuas de carrapatos foram estabelecidas em 1975 (Varma, Pudney e Leake, 1975). Desde então, os avanços na formulação de meios de cultura (Munderloh e Kurtti, 1989) permitiram o isolamento e o cultivo de linhagens celulares de diferentes espécies de carrapatos, as quais foram

estabelecidas a partir de células embrionárias, sendo a maioria delas derivada de espécies economicamente importantes (Bell-Sakyi et al., 2007). Além de propiciarem a ampliação do conhecimento sobre a biologia básica desses animais, também podem auxiliar a compreensão das suas relações com os patógenos que transmitem, bem como com seus hospedeiros. Os cultivos celulares também correspondem a sistemas nos quais as hipóteses podem ser testadas em condições controladas, permitindo que ensaios *in vitro* sejam realizados antes dos ensaios envolvendo o uso de animais (*in vivo*).

Muitas das linhagens de células de carrapatos já foram utilizadas para a propagação de microrganismos, incluindo os intracelulares obrigatórios (Bell-Sakyi et al., 2007). Essas linhagens também já foram utilizadas como modelo para analisar a resposta de carrapatos à infecção por diferentes patógenos. Por exemplo, linhagens celulares foram utilizadas para analisar os efeitos da infecção pela bactéria *Anaplasma marginale* (de la Fuente, Blouin et al., 2007; Zivkovic et al., 2009), agente etilógico da anaplasmoze bovina, e *Anaplasma phagocytophilum* (Zivkovic et al., 2009; Villar, Ayllón, Alberdi, et al., 2015), agente etilológico da anaplasmoze granulocítica humana, sobre a expressão gênica global do carrapato *Ixodes scapularis*. As linhagens celulares de carrapatos ainda são úteis para caracterizar a função de proteínas, por exemplo utilizando RNA de interferência (RNAi) (de la Fuente, Kocan, et al., 2007) ou transformações genéticas (Kurtti et al., 2008).

Mais recentemente, análises do proteoma de linhagens de carrapatos em resposta à infecção por patógenos também têm sido reportadas (Villar, Ayllón, Alberdi, et al., 2015; Weisheit et al., 2015; Grabowski et al., 2016). Análises proteômicas permitem determinar se um determinado estímulo ou condição levam à alterações nos níveis de proteínas de um sistema, além de permitirem determinar a ocorrência de modificações pós-traducionais, de produtos de *splicing* alternativo e de degradação (Boyce, Cullen e Adler, 2004). Um estudo combinando análises transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas foi conduzido para determinar os efeitos da infecção de *A. phagocytophilum* sobre células de *I. scapularis* (Villar, Ayllón, Alberdi, et al., 2015). Foi observado que a infecção afeta a via de

processamento de proteínas pelo retículo endoplasmático, além de alterar o metabolismo da glicose. Um outro estudo combinando análises transcriptômicas e proteômicas mostrou que proteínas envolvidas com a resposta imune, tais como o fator H, e a resposta a estresses, como, por exemplo, a calreticulina, são induzidas pela infecção de células dos carrapatos *Ixodes ricinus* e *I. scapularis* com flavivírus (*tick-borne encephalitis* vírus; TBEV) (Weisheit et al., 2015). Ainda, Grabowski e colaboradores (2016) identificaram um aumento dos níveis de proteínas associadas à tradução de proteínas, metabolismo de aminoácidos e dobramento/transporte/degradação de proteínas frente à infecção de células embrionárias de *I. scapularis* pelo vírus *Langat*, um flavivirus também transmitido por carrapatos e relacionado ao TBEV.

Análises proteômicas também têm sido utilizadas para o estudo da resposta de órgãos de carrapatos à infecção por patógenos (Rachinsky, Guerrero e Scoles, 2007; 2008; Weisheit et al., 2015). Rachinsky e colaboradores determinaram os efeitos da infecção por *Babesia bovis*, agente etiológico da babesiose bovina, sobre o perfil proteico dos ovários (Rachinsky, Guerrero e Scoles, 2007) e intestino (Rachinsky, Guerrero e Scoles, 2008) do carrapato *R. microplus*. Foram observadas diferenças pronunciadas nos níveis de proteínas de membrana ou associadas a membranas nos ovários de carrapatos infectados em relação aos não infectados (Rachinsky, Guerrero e Scoles, 2007). Em relação às proteínas diferencialmente expressas no intestino, destacam-se componentes de citoesqueleto e actina, fatores de apoptose, componentes do metabolismo redox e vias de sinalização intracelular (Rachinsky, Guerrero e Scoles, 2008).

A linhagem BME26, a qual é derivada de células embrionárias de *R. microplus*, foi caracterizada celular e molecularmente por Esteves e colaboradores (Esteves et al., 2008). Também já foi demonstrado que essa linhagem é susceptível à propagação de *Borrelia burgdorferi* (Munderloh et al., 1993), agente etiológico da doença de Lyme, e de *A. marginale* (Esteves et al., 2009). Além disso, células BME26 transcrevem constitutivamente diferentes genes envolvidos nas respostas imunológicas de carrapatos, como ferritina, proteínas de choque térmico, proteínas geradoras de espécies reativas de oxigênio (EROs), proteínas antioxidantes,

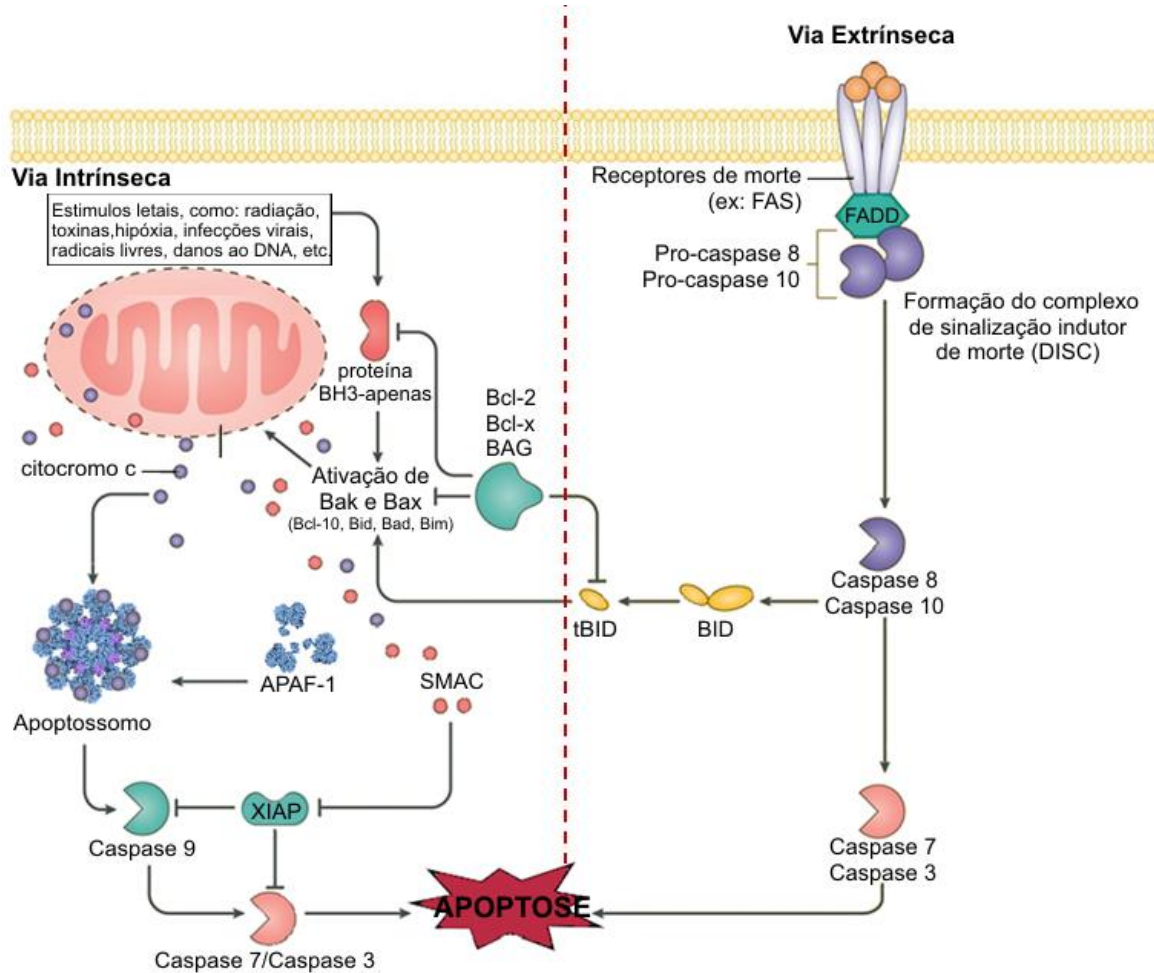
inibidores de proteases e os peptídeos antimicrobianos (PAMs) microplusina, defensina e ixodidina (Esteves et al., 2008). Essa linhagem celular foi ainda utilizada como modelo para analisar a resposta transcricional global em resposta à infecção por *A. marginale* (Bifano et al., 2014). Posteriormente, foi demonstrado que as vias de sinalização e de outros componentes do sistema imune são diferencialmente expressos em células BME26 frente à infecção por *A. marginale* e que essa resposta é diferente daquela desencadeada frente a outros estímulos microbianos (Rosa et al., 2016). Enquanto leveduras e bactérias induzem a expressão de grande parte das CDSs de proteínas relacionadas ao sistema imune, *A. marginale* tem o efeito oposto, reprimindo a maioria das CDSs analisadas. Esses resultados sugeriram que *A. marginale* manipule as células hospedeiras, diminuindo a produção de moléculas antimicrobianas, de modo a favorecer sua proliferação (Rosa et al., 2016). Posteriormente, foi reportado que *A. marginale* também regula o metabolismo redox de células BME26, reprimindo a expressão de enzimas pró-oxidantes e induzindo a expressão de enzimas antioxidantes (Kalil et al., 2017). Além disso, o silenciamento gênico de enzimas pró-oxidantes mediado por RNAi ocasionou um aumento da proliferação da bactéria, demonstrando que um ambiente intracelular antioxidante favorece a proliferação de *A. marginale* (Kalil et al., 2017).

#### **1.4. A apoptose como um mecanismo de defesa contra patógenos**

Após a invasão de um artrópode por microrganismos reações celulares e humorais são deflagradas de modo a eliminar os invasores. Por exemplo, os hemócitos, que são as células circulantes da hemolinfa, realizam a fagocitose ou encapsulamento dos microrganismos invasores. Além disso, diversas moléculas efetoras, tais como PAMs, são produzidas em diferentes tecidos do artrópode, agindo diretamente sobre diferentes microrganismos. Como o sistema imune de artrópodes é mais simples que o sistema imune de vertebrados, não apresentando a resposta imune adaptativa (Baxter, Contet e Krueger, 2017), a apoptose desempenha um papel central na defesa de artrópodes contra patógenos, com o papel de eliminar as células infectadas para o benefício das demais células (Cooper

e Mitchell-Foster, 2011; Ekert, Paul e Vaux, 1997; Lamkanfi e Dixit, 2010; Rudel, Kepp e Kozjak-Pavlovic, 2010).

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada que ocorre em organismos multicelulares, sendo essencial para o desenvolvimento, a manutenção da homeostase e a regulação da resposta imune (Ekert e Vaux, 1997; Elmore, 2007; Zhang, Zhang e Herman, 2003). Esse processo pode ser desencadeado por duas vias principais: a via intrínseca ou mitocondrial, na qual as mitocôndrias desempenham um papel central, e a via extrínseca ou via receptores de morte, na qual os receptores da membrana plasmática atuam como ponto de partida do processo apoptótico [(Ashkenazi, 2008; Derakhshan, Chen e Waes, 2017; Elmore, 2007; Lowe e Lin 2000); **Figura 1**].



**Figura 1. Via intrínseca e via extrínseca de ativação da apoptose.** A apoptose pode ser ativada pela via intrínseca (ou mitocondrial), na qual as mitocôndrias desempenham um papel central, ou pela via extrínseca, na qual receptores da membrana plasmática atuam como ponto de partida no



processo. Ambas levam à ativação de caspases, culminando na apoptose (Ashkenazi 2008; Elmore 2007; Zhang, Zhang, e Herman 2003).  
[Imagem modificada de: <https://biologydictionary.net/apoptosis>]

A via intrínseca envolve diversos estímulos, que podem ser sinais não letais (tais como a ausência de fatores de crescimento), os quais inibem a apoptose, ou sinais letais (por exemplo, danos no DNA), induzindo a apoptose. Os estímulos letais causam mudanças na membrana interna da mitocôndria, ocasionando um aumento da permeabilidade, que leva tanto à perda do potencial de membrana quanto ao extravasamento de proteínas pró-apoptóticas para o citosol, como, por exemplo, citocromo c e SMAC (segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria). No citosol, o citocromo c liga-se ao Apaf-1 (fator ativador da protease apoptótica 1) e à pró-caspase-9, formando um complexo chamado apoptossomo. O apoptossomo, por sua vez, ativa a caspase-9, resultando na ativação das caspases efetoras. O SMAC liga-se à proteína IAP (inibidor de apoptose) e impede a inibição da ativação da caspase-9 que, conseqüentemente, leva à ativação da caspase-3. Essa via é ainda regulada pelas proteínas da família Bcl-2, que é composta por duas subfamílias: as pró-apoptóticas (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim e BH3-apenas) e as anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x, BAG). As proteínas Bcl-2 e Bcl-x estão localizadas na superfície citosólica da membrana mitocondrial e bloqueiam a liberação de citocromo c e de outras proteínas pró-apoptóticas. Dentre as proteínas pró-apoptóticas, a BH3-apenas é a primeira a ser ativada com o sinal apoptótico, sendo responsável pela polimerização das Bak e Bax (Ashkenazi, 2008; Elmore, 2007; Zhang, Zhang e Herman, 2003).

A via extrínseca de sinalização de apoptose, por sua vez, consiste na indução por fatores externos à célula e envolve receptores localizados na membrana celular. Por exemplo, a ativação do receptor de morte Fas (ácido graxo sintetase) estimula o recrutamento de proteínas adaptadoras intracelulares, como o FADD (Fas associado ao domínio de morte), que, uma vez ativados, reúnem as pró-caspases iniciadoras (pró-caspase-8 ou pró-caspase-10), formando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). O complexo leva à ativação das pró-caspases iniciadoras, através da clivagem de seus pró-domínios e dimerização. As caspases

iniciadoras podem, então, ativar as caspases executoras 3 e 7. A ativação da caspase-8 pode ainda levar à ativação de BID (tBID), um membro da família Bcl-2 pró-apoptótico que pode facilitar a liberação de citocromo c das mitocôndrias através da dimerização de Bak e Bax (Ashkenazi, 2008; Elmore, 2007; Zhang, Zhang e Herman, 2003).

Apesar de existirem vias diferentes de ativação da apoptose, ambas culminam na ativação de caspases, uma família de cisteína proteases essenciais tanto para a ativação quanto para a execução da apoptose nas células (Nicholson, 1999; Thornberry e Lazebnik, 1998). As caspases são conservadas evolutivamente e são sintetizadas e mantidas intracelularmente como pró-enzimas (ou zimógenos), sendo necessária a clivagem do pró-domínio para a sua ativação (Cooper, Granville e Lowenberger, 2009; McStay e Green, 2014; Thornberry e Lazebnik, 1998). As caspases efetoras, tais como caspase-3 e caspase-7, são ativadas tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca e sua ação resulta na condensação da cromatina, fragmentação do DNA, degradação de proteínas nucleares e do citoesqueleto, reticulação de proteínas, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligantes para receptores de células fagocitárias e, finalmente, captação por células fagocíticas e eliminação (Elmore, 2007). Outra característica comum de células em apoptose é a translocação da fosfatidilserina da face interna ou citosólica da membrana plasmática para o lado externo das células. A exposição da fosfatidilserina é um fator importante para o reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas (Fadok e Chimini, 2001; Segawa e Nagata, 2015).

Embora a apoptose seja uma resposta evolutivamente conservada e amplamente estudada em mamíferos, relativamente pouco se sabe sobre os componentes desse processo em artrópodes, sendo grande parte dos estudos concentrada em *Drosophila melanogaster* (Cooper e Mitchell-Foster, 2011) e em mosquitos (Bryant et al., 2008). Em *Drosophila*, a caspase Dronc é constitutivamente ativada, ativando a caspase Drice, que, uma vez ativada, culmina na morte celular por apoptose. Para garantir a sobrevivência das células, a proteína 1 de inibição de apoptose de *Drosophila* (DIAP-1) DIAP-1 interage com Dronc, controlando sua atividade e impedindo a ativação de Drice. A apoptose ocorre quando

as proteínas de pró-morte RGH (Reaper, Grim, Hid, Sickie, Jafrac2) são expressas, ocasionando uma perturbação da interação entre DIAP-1 e Dronc (Cooper e Mitchell-Foster, 2011; Steller, 2008).

Nos últimos anos, estudos realizados para a caracterização de fatores moleculares envolvidos nas interações entre patógenos e artrópodes vetores detectaram que diversos componentes das vias de apoptose são modulados pela infecção (Girard et al., 2005; Girard et al., 2007; Kelly, Moon e Bowers, 2012; Eng e Severson, 2016; Ocampo et al., 2013; Kumar et al., 2004; Han et al., 2000; Vlachou et al., 2004; Bartholomay et al., 2004; Hopwood et al., 2001; Ahmed e Hurd, 2006). Por exemplo, a infecção de mosquitos *Culex pipiens quinquefasciatus* pelo vírus do oeste do Nilo (Girard et al., 2005; Girard et al., 2007) leva ao aumento do número de células apoptóticas nas glândulas salivares. A indução da apoptose nas glândulas salivares também é deflagrada pela infecção de mosquitos *Aedes albopictus* pelo vírus Sindbis (Kelly, Moon e Bowers, 2012). Além disso, a infecção viral também leva à ativação da apoptose no intestino de mosquitos *Aedes aegypti* em resposta ao vírus Dengue 2 (Denv-2), sendo que essa ativação ocorre apenas em uma linhagem de mosquitos que é refratária ao vírus, não ocorrendo em uma linhagem susceptível (Eng e Severson, 2016; Ocampo et al., 2013). A indução da apoptose no intestino de mosquitos *Anopheles stephensi* (Han et al., 2000; Kumar et al., 2004) e em *Anopheles gambiae* (Vlachou et al., 2004) também já foi reportada pela infecção por um protozoário, *Plasmodium berghei*. Além disso, CDSs de proteínas envolvidas com apoptose, tais como uma caspase e isoformas da proteína 1 associada com morte (Death-associated protein; DAP-1) também foram induzidas em hemócitos dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Armigeres subalbatus* pela infecção simultânea com *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa) e *Micrococcus luteus* (bactéria Gram-positiva) (Bartholomay et al., 2004). Também já foi demonstrado que a infecção dos mosquitos *Anopheles stephensi* (Hopwood et al., 2001) e *Anopheles gambiae* (Ahmed e Hurd, 2006) por *Plasmodium yoelii nigeriensis* leva à apoptose e reabsorção de folículos germinativos nos ovários de fêmeas infectadas, impactando negativamente o *fitness* reprodutivo. É provável que a apoptose nos ovários seja uma tentativa do mosquito de poupar energia para combater a infecção.

Como mencionado anteriormente, a apoptose é importante na defesa do organismo contra infecções, uma vez que leva à eliminação da célula infectada, impedindo, dessa maneira, a proliferação do patógeno (Ekert e Vaux, 1997; Bergsbaken e Cookson, 2009; Zitvogel, Kepp e Kroemer, 2010; Lamkanfi e Dixit, 2010; Rudel, Kepp e Kozjak-Pavlovic, 2010). Em contrapartida, microrganismos intracelulares usam diferentes estratégias e mecanismos para inibir a apoptose, a fim de garantir a sua replicação e sobrevivência na célula hospedeira (Ashida et al., 2011; Carlyon e Fikrig, 2003; Galindo et al., 2012; de la Fuente et al., 2016; Lee et al., 2008; Lee e Goodman, 2006; Rikihisa, 2011; Rudel, Kepp e Kozjak-Pavlovic, 2010; Woldehiwet e Yavari, 2014; Ramphul et al., 2015). Em bactérias, por exemplo, o efector Ats-1 do T4SS de *A. phagocytophilum* age na mitocôndria da célula hospedeira, atrasando a apoptose (Niu et al., 2010), o que é fundamental para que a bactéria finalize seu ciclo de vida em neutrófilos (Yoshiie et al., 2000; Ge e Rikihisa, 2006). Além disso, *A. phagocytophilum* é capaz de manipular a apoptose em células de carrapatos (Alberdi et al., 2016; Ayllón et al., 2013; Villar, Ayllón, Kocan, et al., 2015; Cabezas-Cruz et al., 2016). Estudos anteriores também demonstraram que *R. rickettsii* é capaz de manipular a apoptose de células endoteliais humanas (Joshi et al., 2004; Joshi et al., 2003; Bechelli et al., 2009; Clifton et al., 1998). Porém, não há estudos correlacionando a apoptose com a infecção de carrapatos por espécies do gênero *Rickettsia*, assim como a caracterização destas vias é insuficiente em carrapatos.

## 2. OBJETIVOS

Com base nos dados da literatura acima apresentados, o objetivo geral deste estudo foi determinar o conjunto de proteínas (proteoma) diferencialmente expresso em células embrionárias do carrapato *R. microplus* (linhagem BME26) em resposta à infecção por *R. rickettsii*. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram cumpridos:

1. Determinação do proteoma de células BME26 infectadas por *R. rickettsii* ou não infectadas (controle) utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas *in tandem* (LC-MS/MS);
2. Determinação dos efeitos do silenciamento de CDSs de proteínas envolvidas na apoptose, mediado por RNAi, sobre a proliferação de *R. rickettsii* em células BME26;
3. Avaliação dos efeitos da infecção por *R. rickettsii* no processo de apoptose de células BME26;
4. Avaliação dos efeitos da ativação e da inibição química da apoptose sobre a proliferação de *R. rickettsii* em células BME26.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cultivo de células

As células embrionárias do carrapato *R. microplus* (BME26) foram cultivadas em meio de cultura L-15B300 (Munderloh et al., 1999), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell, Brasil) termo-inativado, 10% de meio triptose fosfato (BD Difco, EUA), 0,1% de concentrado de lipoproteínas bovinas (MP Biomedicals, Alemanha), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (ambos antibióticos da Life Technologies, EUA), sendo o pH acertado para 7,2, conforme descrito por (Munderloh e Kurtti, 1989). As células foram mantidas a 34°C e subcultivadas semanalmente. Para os experimentos de infecção das células BME26 com *R. rickettsii*, o meio de cultura foi substituído por meio sem antibióticos 72 h antes da infecção.

A linhagem endotelial de células microvasculares HMEC-1 (ATCC: CRL-3243; gentilmente cedida pela Profa. Dra. Heloisa Sobreiro S. de Araújo, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil) foi cultivada em meio 131 com um suplemento de crescimento microvascular (MVGS; ambos da Gibco, EUA) e mantida em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, sendo subcultivada a cada dois dias.

O número de células viáveis por mL foi determinado utilizando um contador de células automático (TC20<sup>®</sup> Bio-Rad, EUA) após a coloração como uma solução de Tripán a 0,4% (Bio-Rad, EUA).

#### 3.2. *R. rickettsii*

A cepa Taiaçu de *R. rickettsii* foi originalmente isolada de um espécime carrapato *A. aureolatum* proveniente do município de Mogi das Cruzes, São Paulo, e amplificada pela inoculação do homogeneizado deste espécime de carrapato em cobaias, sendo posteriormente mantida em uma cultura de células Vero (ATCC: CCL-81, EUA) *in vitro* conforme descrito por (Pinter e Labruna, 2006). De modo a obter-se um inóculo em células de carrapatos, um inóculo de *R. rickettsii* em células Vero, foi utilizado para infectar células BME26. Para tal, as células Vero infectadas foram submetidas a três ciclos de choque térmico de 2 min a 37°C e 30 s em N<sub>2</sub>

líquido. Ao final do procedimento, o inóculo foi utilizado para a infecção de  $1,0 \times 10^7$  células BME26, utilizando uma MOI (multiplicidade de infecção igual a 10. Após 72 h a  $34^\circ\text{C}$ , as células foram descoladas com uma solução de tripsina (concentração final 0,025 g/L; Vitrocell, Brasil), por 1 min e transferidas para outras cinco garrafas de células BME26 (contendo  $1,0 \times 10^7$  células cada). Após 48 h a  $34^\circ\text{C}$ , as células foram descoladas com tripsina conforme descrito anteriormente e centrifugada a  $3.000 \times g$  por 10 min. O sedimento resultante foi ressuspensionado em meio de congelamento composto por 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) e 5% SFB em meio de cultura L-15B300 suplementado e sem antibióticos (descrito no item 3.1). Alíquotas de células BME26 contendo  $2,5 \times 10^6$  riquetsias/ $\mu\text{L}$  foram armazenadas em  $\text{N}_2$  líquido e utilizadas como inóculo nos experimentos de infecção experimental de células *in vitro* (item 3.3).

### **3.3. Infecção experimental de células *in vitro***

Primeiramente, um inóculo de *R. rickettsii* em células BME26 foi submetido a três ciclos de choque térmico de 2 min a  $37^\circ\text{C}$  e 30 s em  $\text{N}_2$  líquido. Em seguida, as células BME26 cultivadas em meio de cultura sem antibióticos foram infectadas utilizando uma MOI = 10. Como controle, as células foram incubadas com um lisado de células BME26 não infectadas, obtido pelo procedimento de choque térmico descrito acima. O mesmo procedimento foi realizado para infecção das células HMEC-1.

Para a visualização das células infectadas por microscopia ótica, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular foi centrifugada por 5 min a 500 RPM contra uma lâmina de vidro, utilizando-se uma citocentrífuga (Citospin® Fanem, Brasil). As células aderidas às lâminas foram coradas utilizando o método de Gimenez (Garduno et al., 2002). Após a coloração, as células foram observadas sob microscópio de luz Zeiss-Axiophot (Zeiss, Alemanha), utilizando-se um aumento de 1.000x.

Quando destinadas à extração de ácidos nucleicos, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS; NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8 mM; pH 7,4) estéril e descoladas com solução de tripsina (item 3.2). A

suspensão celular foi centrifugada a 1.500 x g por 10 min a 4°C. O sedimento celular foi ressuspenso em 50 µL de RNA/ater (Thermo Fisher Scientific, EUA) e mantido a -20°C até a extração de ácidos nucleicos (item 3.4). Quando destinadas à extração de proteínas, as células foram descoladas e processadas conforme descrito no item 3.6.

### **3.4. Extração de ácidos nucleicos**

As células foram submetidas ao isolamento simultâneo de DNA genômico (DNAg) e de RNA total pela utilização do Kit blackPREP Tick DNA/RNA (Analytik Jena, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante. Ao final do procedimento, as concentrações de DNAg e de RNA foram determinadas em um espectrofotômetro (modelo NanoDrop-1000, Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras de DNAg e de RNA foram armazenadas a -20°C e a -80°C, respectivamente, até a sua utilização nos experimentos.

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

O número de bactérias nas células foi determinado através de reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) com sonda TaqMan específica para o gene de cópia única *gltA* (codificador da citrato sintase) de *Rickettsia* spp. (Galletti et al., 2013; Labruna et al., 2004). Para cada reação, foram utilizados 2 µL de amostra (DNAg), 7,7 µL de *Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Lituânia), 8 pmols dos oligonucleotídeos CS-5 (5'-GAG AGA AAA TTA TAT CCA AAT GTT GAT-3') e CS-6 (5'- AGG GTC TTC GTG CAT TTC TT-3'), e 0,5 pmol da sonda interna fluorogênica CS-5-6 (5' - 56 FAM - CAT TGT GCC ATC CAG CCT ACG GT - BHQ 1 - 3'), sendo o volume de 16 µL completado com água livre de nucleases. Em um termociclador StepOnePlus™ e com o auxílio do software StepOne v2.3 (ambos da Thermo Fisher Scientific), realizou-se um programa térmico de 10 min a 95°C seguidos de 45 ciclos de 15 s a 95°C, 15 s a 55°C e 30 s a 72°C. O número de cópias de *R. rickettsii* foi determinado de acordo com uma curva padrão obtida pela amplificação de diferentes diluições de um fragmento de



147 pb do gene *gltA* de *R. rickettsii* ( $1,4 \times 10^7$  a  $1,4 \times 10^2$  cópias) ligado a um plasmídeo. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As amostras de DNAg extraído de células não infectadas também foram analisadas para que a ausência de infecção fosse confirmada.

O tempo de duplicação de *R. rickettsii* foi determinada pela seguinte fórmula, considerando-se apenas a fase de crescimento logarítmica:

$$\begin{aligned} \text{taxa crescimento} &= [\ln(\text{No. de células final}) - \ln(\text{No. de células inicial})] / [\text{tempo final} - \text{tempo inicial}] \\ \text{tempo de duplicação} &= \ln 2 / (\text{taxa de crescimento}) \end{aligned}$$

### 3.6. Análise de proteínas por LC-MS/MS

Cinco réplicas biológicas (cinco garrafas) de células BME26 não infectadas e cinco réplicas biológicas de células BME26 infectadas em dois tempos de crescimento bacteriano (6 e 48 h) foram obtidas conforme procedimento descrito no item 3.3. As células foram descoladas das garrafas com o auxílio de um dispositivo *cell scraper* (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, EUA) em 1,5 mL de tampão SPG estéril (sacarose 218 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,76 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,1 mM; glutamato de potássio 4,9 mM) contendo um coquetel de inibidores de proteases (P2714, Sigma-Aldrich, EUA). Após centrifugação a 1.500 x g por 10 min, as células foram ressuspendidas em tampão de lise (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM; uréia 8 M contendo o mesmo coquetel de inibidores de proteases acima descrito) e, em seguida, rompidas por choque-térmico (3 ciclos de 2 min a 30°C e 30 s em N<sub>2</sub> líquido).

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada utilizando-se o kit do ácido bicinconínico (BCA; Pierce™, Thermo Fisher Scientific, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Cinquenta µg de proteínas de cada réplica biológica de cada um dos dois grupos foram submetidos à redução das pontes de dissulfeto com ditioneitol (DTT; concentração final de 5 mM). Em seguida, os resíduos de cisteína foram alquilados com iodoacetamida (IAA; concentração final de 10 mM) e as proteínas foram digeridas com tripsina (concentração final de 1 µg; Promega, EUA) por 16 h. A reação foi interrompida pela adição de ácido trifluoroacético (TFA; concentração final de 1%), conforme descrito por (Nakayasu et al., 2012). Dez µg dos peptídeos resultantes foram dessalinizados com ZipTip C<sub>18</sub>

(Millipore Corporation, EUA), conforme recomendações do fabricante, e concentrados em centrífuga a vácuo. Os peptídeos foram ressuspensos em ácido fórmico 0,1% e submetidos a uma análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas *in tandem* (LC-MS/MS) na *core facility* Biomass do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) da USP. Os peptídeos foram separados em uma coluna analítica EASY-Column (10 cm x 75  $\mu$ m, 3  $\mu$ m) acoplada a um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), modelo Easy Nano-LC (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para a eluição dos peptídeos, foi utilizado um gradiente linear de 0 a 35% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico em 75 min e fluxo de 300 nL/min. A voltagem do nano-*electrospray* foi de 1,7 kV e a temperatura de 275°C. O espectrômetro de massas (modelo LTQ Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific, EUA) foi operado em modo *data-dependent*, alternando automaticamente entre os modos MS e MS/MS. Os espectros de MS foram adquiridos entre m/z 400 e m/z 2000 no analisador Orbitrap, com resolução de 60.000. Os 20 íons mais intensos dos espectros de MS foram selecionados e fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID) de baixa resolução, com energia de colisão normalizada de 35%. Todas as réplicas biológicas foram analisadas em duplicata técnica.

Os dados brutos brutos (.raw) provenientes das análises foram importados para o programa MaxQuant versão 1.5.2.8 (Cox e Mann, 2008) e a ferramenta de busca Andromeda (Cox et al., 2011) foi utilizada para pesquisar espectros MS/MS contra uma base de dados. Esse banco de dados foi composto de sequências de aminoácidos deduzidas de transcritos obtidos por RNA-seq de células BME26 (dados não publicados), gentilmente cedido pela Profa Dra. Sirlei Daffre (USP, São Paulo, Brasil), juntamente com sequências de proteínas de bactérias do gênero *Rickettsia*, disponíveis no Uniprot, totalizando 65.279 sequências. Na busca, foi utilizada tolerância de 10 ppm para o íon precursor e 0,02 Da para os íons fragmentos e considerando-se a clivagem por tripsina, a carbamidometilação (57,021 Da) como modificação fixa e a oxidação da metionina (15,994 Da) como modificação variável. Os peptídeos foram validados aplicando-se filtro para índice de falso positivo menor que 1%.

O proteoma diferencial das células infectadas em relação às células não infectadas (controle) foi determinado utilizando o método LFQ (*Label-free quantification*) pelo software Perseus v.1.5.2.6. Apenas proteínas com  $p \leq 0,05$  (teste t de Student) com correção por múltiplos testes [*False Discovery Rate (FDR)*] menor que 5 % e com valores de *fold-change*  $\geq 1,5$  ou  $\leq 0,67$  foram consideradas moduladas pela infecção. Além disso, as proteínas identificadas exclusivamente nas amostras infectadas ou nas amostras controle também foram consideradas como moduladas.

A análise de principal componente (PCA) foi realizada utilizando a plataforma online MetaboAnalyst 3.0 [(www.metaboanalyst.ca) (Xia et al., 2009)].

### 3.7. Silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi)

#### 3.7.1. Desenho e síntese de oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos específicos para cada CDS selecionada para a avaliação dos efeitos do silenciamento gênico por RNAi (item 3.8) foram desenhados utilizando-se o programa Primer 3 (Rozen e Skaletsky, 2000). Todos os oligonucleotídeos foram analisados pelo programa OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., EUA) para a avaliação da formação de dímeros e estruturas como *hairpins* e aqueles que foram considerados adequados foram sintetizados pela Thermo Fisher Scientific. Os oligonucleotídeos para RNAi foram sintetizados acoplados a uma cauda T7 (5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG G - 3') (Tabela 2).

**Tabela 2. Oligonucleotídeos específicos para as CDSs de proteínas moduladas pela infecção para as análises por RT-qPCR e para o silenciamento gênico por RNAi.**

Gene	ID	Oligonucleotídeos
Mucina-1 - regulação negativa da via intrínseca de sinalização de apoptose	BME26USP-3827	5'- GAA GCC TCT CGT CTC CGA AT -3' 5'- GTT CGG CTG GAA ATC TGA AA -3'
	dsBME26USP-3827	5'- <u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG</u> GCG TCC AAG GAT AAG CAC GAT -3' 5'- <u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG</u> GGG CGA AAA GAT GCA ACA CGA -3'
Indutor de condensação de cromatina apoptótica no núcleo	BME26USP-64008	5'- AGC AAG GCG AAG ATG AAC TG -3' 5'- TCG TCG GGG TAG CTT CTC TT -3'
	dsBME26USP-64008	5'- <u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG</u> GTG ACA GAA ATG AGA CGG CGG -3' 5'- <u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG</u> GGA AGT AGT CGG TGT CGG GAC -3'
Grupo D2 de complementação da anemia de Fanconi - regulação negativa do processo apoptótico	BME26USP-77602	5'- TGT TCG CGC CGA TAG ACA TT -3' 5'- CGC TTG GGT CGT CGT AGT AG -3'
	dsBME26USP-77602	5'- <u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG</u> GCA GGA GTT GAA TGT GGC GTA -3' 5'- <u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG</u> GAA AGT GGG CAA ACA AAC AGC -3'

GFP (proteína fluorescente verde)	dsGFP	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG CGA CGT AAA CGG CCA CAA GTT -3' 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GCG GGT CTT GTA GTT GCC GTC -3'
Proteína ribossomal S3A	S3A	5'- GGA CGA CCG ATG GCT ACC T -3' 5'- TGA GTT GAT TGG CGC ACT TCT -3'

### 3.7.2. Síntese de cDNA

Quinhentos ng de RNA total extraído de células BME26 foram submetidos ao tratamento com DNase RQ1 (Promega, EUA) para a remoção de resíduos de DNAG. O RNA resultante foi utilizado como molde para a transcrição reversa em cDNA. Para tal, 10 pmols do oligo dT *Anchor* e 1 µL de uma mistura de dNTPs (concentração final de 0,4 mM) foram adicionados ao RNA e a mistura foi incubada por 5 min a 65°C. Após resfriamento em banho de gelo por 1 min, adicionou-se 4 µL do tampão para a enzima M-MLV (Invitrogen) concentrado 5x, 2 µL de DTT (concentração final de 0,1M). Após incubação a 37°C por 2 min, foi adicionado 1 µL de M-MLV RT (200U/µL). A mistura foi incubada a 37°C por 50 min e termo-inativada por 15 min a 70°C. A concentração de cDNA nas amostras resultantes foi determinada em um espectrofotômetro (NanoDrop-1000, Thermo Fisher Scientific), sendo as amostras armazenadas a -20°C até a sua utilização nas reações.

### 3.7.3. Teste dos oligonucleotídeos por PCR convencional

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

Os produtos da PCR (*amplicons*) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE [Tris-base hidroximetilaminometano (TRIS) 0,09 M, ácido bórico 0,09 M, ácido etileno diamino tetracético (EDTA) 0,5M]. Um tampão de amostra contendo glicerol 50%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0,25% (p/v) e xilenocianol 0,25% (p/v) foi adicionado às amostras em uma proporção de 1:6,

respectivamente, e, após homogeneização, as amostras foram aplicadas no gel. Após eletroforese com voltagem constante de 100 V por 60 min e tratamento do gel com Gel RED™ (Uniscience, EUA), os *amplicons* foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) em um transluminador acoplado a um sistema de imagens (modelo ImageQuant™ 300, GE Healthcare).

#### **3.7.4. Determinação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos por RT-qPCR**

A eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos para avaliação do silenciamento e testados por PCR convencional que apresentaram um único *amplicon* com o tamanho esperado foi determinada por RT-qPCR. Para isso, oito µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (Thermo Scientific), 1 µL de cada oligonucleotídeo específico (concentração final 0,2 pmol/µL) e 4 µL de água ultrapura foram adicionados a diferentes concentrações de cDNA (400 – 3,12ng; diluições seriadas de 2x). Como controle negativo, as reações foram realizadas na ausência de cDNA. As reações foram realizadas em um termociclador StepOnePlus™ software StepOne v2.3 (Life Technologies) utilizando-se o programa térmico de 10 min a 95°C seguidos de 40 ciclos de 15 s a 95°C, 60 s a 60°C e 20 s a 72°C. Ao término da reação, o Cq (ciclo de quantificação) para cada diluição foi utilizado para a determinação da eficiência dos oligonucleotídeos, conforme descrito por (Larionov, Krause e Miller, 2005; Livak e Schmittgen, 2001). Apenas oligonucleotídeos com eficiência entre 90-110% foram utilizados nos experimentos.

#### **3.7.5. Síntese de dsRNA**

Os oligonucleotídeos específicos (contendo a cauda T7) para as CDSs das proteínas selecionadas para a caracterização funcional (**Tabela 2**) foram utilizados para a amplificação de cDNA, utilizando como molde o cDNA de células BME26 (item 3.7.2.). O cDNA obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 3.7.3., para a confirmação da obtenção de um *amplicon* único e com o tamanho esperado. O *amplicon* foi isolado utilizando-se o kit Wizard®

SV Gel Clean-Up System (Promega) e utilizado como molde para a síntese de duplas fitas de RNA (dsRNA) pela utilização do kit T7 Ribomax Express RNAi System (Promega), de acordo com as recomendações dos respectivos fabricantes. Como controle (gene não-relacionado), foi utilizado um fragmento da CDS da proteína fluorescente verde (GFP; **Tabela 2**) inserido no plasmídeo pRSET, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gerhard Wunderlich (USP, São Paulo, Brasil).

### **3.7.6. Tratamento das células com dsRNA**

Após sua síntese, as dsRNA foram suspensas em PBS estéril e, em seguida, a concentração foi determinada em espectrofotômetro (NanoDrop-1000, Thermo Fisher Scientific). As células BME26 foram incubadas com  $10^{13}$  moléculas de dsGFP ou de dsRNA para as CDSs das proteínas selecionadas em meio de cultivo sem antibiótico. Após 24 h a 34°C, as células foram infectadas com *R. rickettsii*, conforme descrito no item 3.3. Após 48 h adicionais, as células foram descoladas com solução de tripsina e a suspensão celular foi centrifugada a 1.500 x g por 10 min a 4°C. O sedimento celular foi ressuspensionado em 50 µL de RNA/later (Thermo Fisher Scientific) e mantido a -20°C até a extração de ácidos nucleicos (item 3.4). Todas as amostras foram analisadas em triplicatas técnicas. Foram analisadas 10 réplicas biológicas para cada grupo.

### **3.7.7. Avaliação do silenciamento gênico por RT-qPCR**

O RNA total extraído das células tratadas com dsRNA e infectadas com *R. rickettsii* foi tratado com DNase e utilizado como molde para a síntese de cDNA (item 3.7.2). O cDNA obtido, por sua vez, foi utilizado como molde para a avaliação do silenciamento gênico por RT-qPCR utilizando o mesmo equipamento e condições utilizados para a determinação da eficiência dos oligonucleotídeos (item 3.7.5). A quantidade de cDNA das amostras foi normalizada de acordo com a expressão da CDS da proteína ribossômica S3A. O nível de silenciamento da expressão de cada CDS de interesse foi obtido considerando-se o nível de expressão da mesma CDS no controle (células tratadas com dsGFP) como 100%, calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , conforme interpretação proposta por (Livak e

Schmittgen, 2001). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student, sendo o silenciamento considerado significativamente diferente em relação ao GFP quando  $p < 0,05$ .

### **3.7.8. Avaliação dos efeitos do silenciamento gênico na proliferação de *R. rickettsii***

O DNAg extraído das células BME26 tratadas com dsGFP (controle) ou dsRNA para as CDSs das proteínas selecionadas foi utilizado para a quantificação de *R. rickettsii* por qPCR TaqMan (item 3.5). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student, sendo a quantidade de bactérias nas células tratadas com dsRNA específicas para as CDSs das proteínas selecionadas consideradas significativamente diferente em relação ao controle quando  $p < 0,05$ .

## **3.8. Avaliação de morte celular por apoptose**

### **3.8.1. Avaliação de fragmentação de DNAg por eletroforese em gel de agarose**

Cinquenta ng de amostras de DNAg extraído de células BME26 não infectadas ou infectadas por *R. rickettsii* por 6, 24, 48, 72, 96 e 120 h foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE, conforme descrito no item 3.7.3.

### **3.8.2. Ensaio de Citotoxicidade**

A citotoxicidade da estaurosporina (Sigma-Aldrich, EUA) e do inibidor de caspase-3 Z-DEVD-Fmk (Calbiochem®, EUA) sobre a linhagem BME26 foi avaliada por ensaio de viabilidade celular com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2-5 difenil tetrazólio; Sigma, EUA) (Mosmann, 1983). As células foram transferidas para placas de 24 poços ( $1,00 \times 10^5$  células por poço). Após 24 h a  $34^\circ\text{C}$ , as células foram expostas a diferentes concentrações de estaurosporina (concentrações finais de 800, 400, 200 ou 100 nM) ou de Z-DEVD-Fmk (concentrações finais de 25, 10, 5 ou  $1\mu\text{M}$ ), previamente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). Como controle, as células foram incubadas na ausência de estaurosporina ou do inibidor, mas

utilizando DMSO como controle (concentração final de 0,4 % ou 0,25% respectivamente). Após 120 h, o meio de cultura foi removido e o MTT adicionado às células (concentração final de 0,5 mg/mL) seguido de incubação por 2 h a 34°C. Após a incubação, a solução de MTT foi removida e 200  $\mu$ L de uma mistura de isopropanol 100% com HCl a 0,002% foram adicionados às células. A absorbância foi aferida em espectrofotômetro utilizando comprimentos de onda de 595 nm ( $Abs_{595nm}$ ) e referência de 690 nm ( $Abs_{690nm}$ ). Foram utilizadas três triplicatas biológicas para cada condição analisada, as quais tiveram as absorbâncias aferidas em triplicatas técnicas. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste t de Student, sendo a viabilidade considerada significativamente diferente em relação ao controle quando  $p < 0,05$ . A porcentagem de viabilidade nas células tratadas em relação ao controle foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{Abs_{(595nm - 690nm)} \text{ células tratadas}}{Abs_{(595nm - 690nm)} \text{ controle}} \times 100$$

### 3.8.3. Ensaio enzimático para avaliação da atividade de caspase-3

Células BME26 não infectadas ou infectadas previamente por *R. rickettsii* por 48 h foram incubadas com 100, 200, 400 ou 800 nM de estaurosporina (Sigma-Aldrich) solubilizada em DMSO por 6 h. Como controle, as células foram incubadas na ausência de estaurosporina (apenas na presença de DMSO na concentração final de 0,4%). O mesmo ensaio foi utilizado para avaliar a atividade de caspase-3 em células BME26 previamente infectadas com *R. rickettsii* por 24, 36, 48, 60 ou 72 h e tratadas com estaurosporina a 400 nM por 6 h.

A atividade de caspase-3 em células BME26 desafiadas com *R. rickettsii* termo-inativadas a 56 °C por 1 h também foi avaliada. Para confirmar a completa inativação das riquetsias após o tratamento térmico e antes da realização dos ensaios enzimáticos, as riquetsias foram transferidas para células BME26 (conforme descrito no item 3.3) e seu crescimento avaliado por até 72 h (conforme procedimento descrito no item 3.5). Após a confirmação da termo-inativação, células BME26 não infectadas, infectadas previamente por 48 h ou desafiadas com riquetsias termo-inativadas foram incubadas com 400 nM de estaurosporina por 6 h.



Avaliamos ainda a atividade de caspase-3 em células BME26 não infectadas frente ao tratamento com o inibidor de caspase Z-DEVD-Fmk (Calbiochem®, EUA). A atividade de caspase-3 foi determinada após 48 h de tratamento das células com diferentes concentrações do inibidor (concentrações finais de 25, 10, 5 ou 1  $\mu$ M) e comparadas com o controle (células incubadas na ausência do inibidor).

As células foram descoladas com solução de tripsina e centrifugadas a 1.500 x g por 10 min a 4°C, sendo o sedimento celular ressuspensionado em 80  $\mu$ L de tampão de lise contendo PIPES (Piperazina-N,N'-bis[ácido 2-etanossulfônico]) 20mM, NaCl 100mM, EDTA 2mM, CHAPS {3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanossulfonato} 0,1%, sacarose 10%, Triton X-100 0,1%, PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) 1mM e pepstatina A 2 $\mu$ M em pH 7,2. Após a centrifugação a 13.000 RPM por 5 min a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C até a sua utilização.

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada utilizando-se o kit BCA, de acordo com os procedimentos do fabricante. Cinquenta  $\mu$ g de proteína de cada amostra foi utilizado para o ensaio de atividade enzimática. As amostras foram incubadas com 50  $\mu$ M do substrato sintético Ac-DEVD-AMC (Calbiochem®, EUA) em placas de 96 (FluoroNunc™ – Nunc, EUA) em tampão HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico] 50 mM; pH 7,0) na presença de DTT 10mM. A liberação do AMC (7-amino-4-metil cumarínico) foi monitorada continuamente em intervalos de 5 min por um período de 1 h a 37 °C em fluorímetro (SpectraMax® i13, Molecular Devices, EUA), utilizando comprimentos de onda de 380 nm de excitação e 460 nm de emissão. O valor de unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) obtido no tempo zero foi subtraído do valor obtido após 60 min de reação ( $\Delta$ UAF). Em seguida, a atividade relativa da caspase-3 foi calculada utilizando a razão do  $\Delta$ UAF de cada condição pelo  $\Delta$ UAF da condição referência adotada para cada experimento.

Pelo menos três réplicas biológicas de cada condição foram analisadas. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o teste t de Student, sendo a atividade de caspase-3 considerada significativamente diferente quando  $p < 0,05$ .

#### **3.8.4. Avaliação de apoptose por microscopia de fluorescência**

As células BME26 foram transferidas para lamínulas em placas de Petri de 12 mm (Nunc™ *Glass Bottom Dishes*;  $1,2 \times 10^6$  células por placa) e mantidas a 34°C por 24h. Em seguida, as células BME26 foram infectadas com *R. rickettsii* ou desafiadas com riquetsias termo-inativadas. Como controle, foram utilizadas células não infectadas. Após 48 h, 400 nM de estaurosporina foram adicionados a cada uma das placas e após 6 h adicionais, foram adicionados 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de anexina V conjugada a Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, EUA), 0,25  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Hoechst 33342 e 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Iodeto de propídeo (PI). Após 15 min, as células foram observadas e as imagens adquiridas em microscópio de fluorescência (Leica DMI6000B/AF6000, EUA) acoplado a um sistema de câmera digital (DFC 365 FX, Leica) foram processadas pelo programa *Leica Suite X* (LAS X). O número de células marcadas com anexina V foi determinado pela utilização do program *Image J* (Schneider, Rasband e Eliceiri, 2012)

#### **3.8.5. Avaliação dos efeitos da apoptose na proliferação de *R. rickettsii* em células BME26**

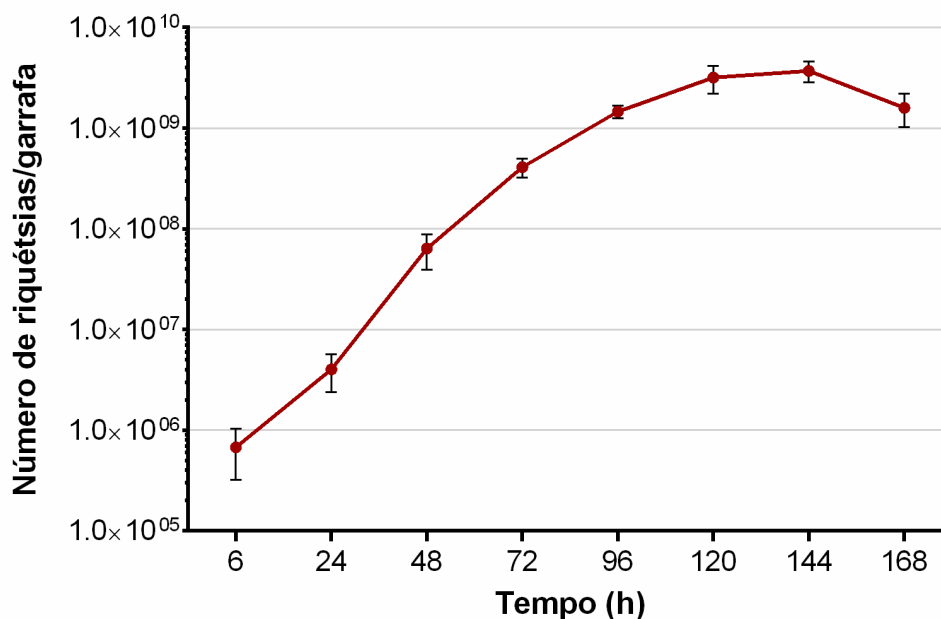
As células BME26 foram incubadas com 10  $\mu\text{M}$  do inibidor de caspase-3 (Z-DEVD-Fmk) ou com 400 nM de estaurosporina. Após 1 h, as células foram infectadas com *R. rickettsii*. A quantificação de *R. rickettsii* nas células BME26 foi determinada após 6, 24, 48, 72, 96 e 120 h por qPCR, conforme descrito no item 3.5. O mesmo procedimento foi utilizado para avaliar o crescimento de *R. rickettsii* em células BME26 tratadas com estaurosporina apenas 24 h após o início da infecção.

Todos os tratamentos foram amostrados em triplicatas técnicas. As diferenças do crescimento bacteriano nas células BME26 tratadas com estaurosporina ou com Z-DEVD-Fmk em relação ao controle (células não tratadas) foram identificadas utilizando um teste baseado em *bootstrap*, sendo os pontos considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

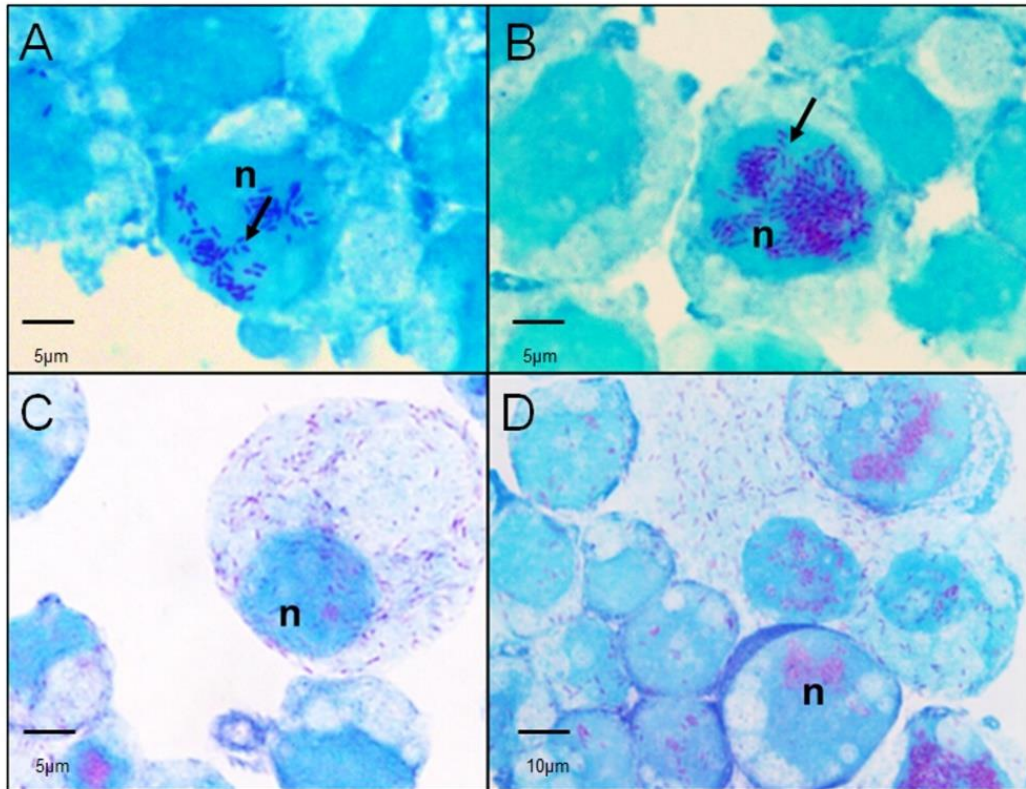
### 4.1. Avaliação da infecção de linhagens celulares pela cepa Taiçu de *R. rickettsii*

Primeiramente, a curva de crescimento de *R. rickettsii* foi determinada em células BME26. O crescimento bacteriano foi avaliado por qPCR após 6 h e a cada 24 h ao longo de um período de 7 dias, apresentando um tempo de duplicação de 8,5 h (Figura 2).



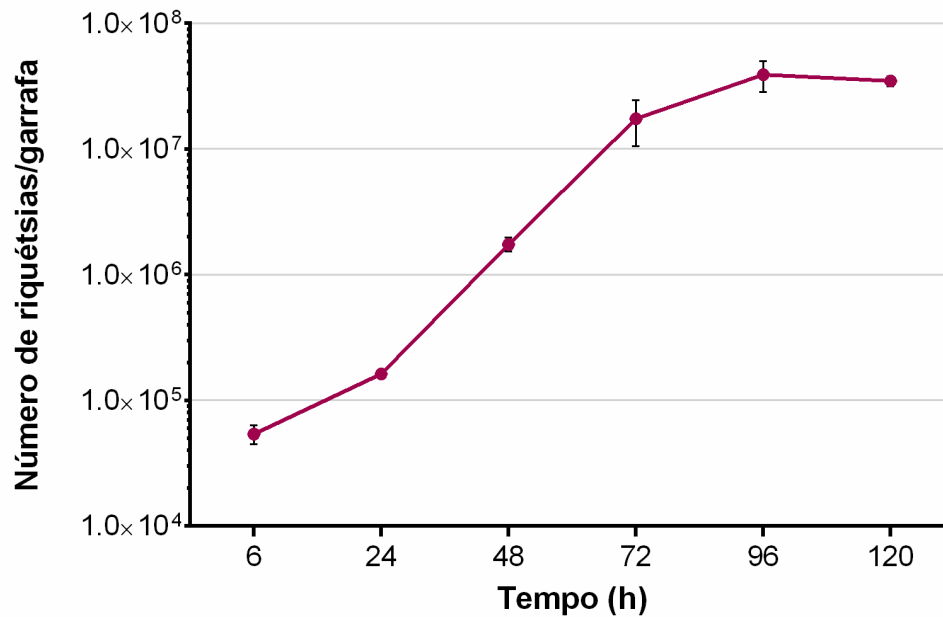
**Figura 2. Curva de crescimento de *R. rickettsii* em células BME26.** Células BME26 foram inoculadas com *R. rickettsii* (MOI =10) e o número de bactérias após 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h foi determinado por qPCR utilizando sonda TaqMan e oligonucleotídeos específicos para o gene *gltA* de *R. rickettsii*.

Alíquotas das células coletadas em cada ponto da curva de crescimento foram observadas sob microscopia ótica. Conforme esperado, foi observado um aumento gradual da quantidade de bactérias ao longo da infecção (Figura 3). Além disso, aproximadamente 100% das células BME26 encontravam-se infectadas 96 h após a adição do inóculo de *R. rickettsii* (Figura 3D).



**Figura 3. Fotomicrografia de células BME26 infectadas por *R. rickettsii*.** Alíquotas de células BME26 retiradas após 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C) e 96 h (D) do início da infecção por *R. rickettsii* foram coradas pelo método de Gimenez e observadas sob microscopia óptica. Observa-se a concentração de riquétsias (bastonetes de coloração púrpura indicados pelas setas) nos núcleos das células (n), principalmente nos tempos de 24 e 48 h.

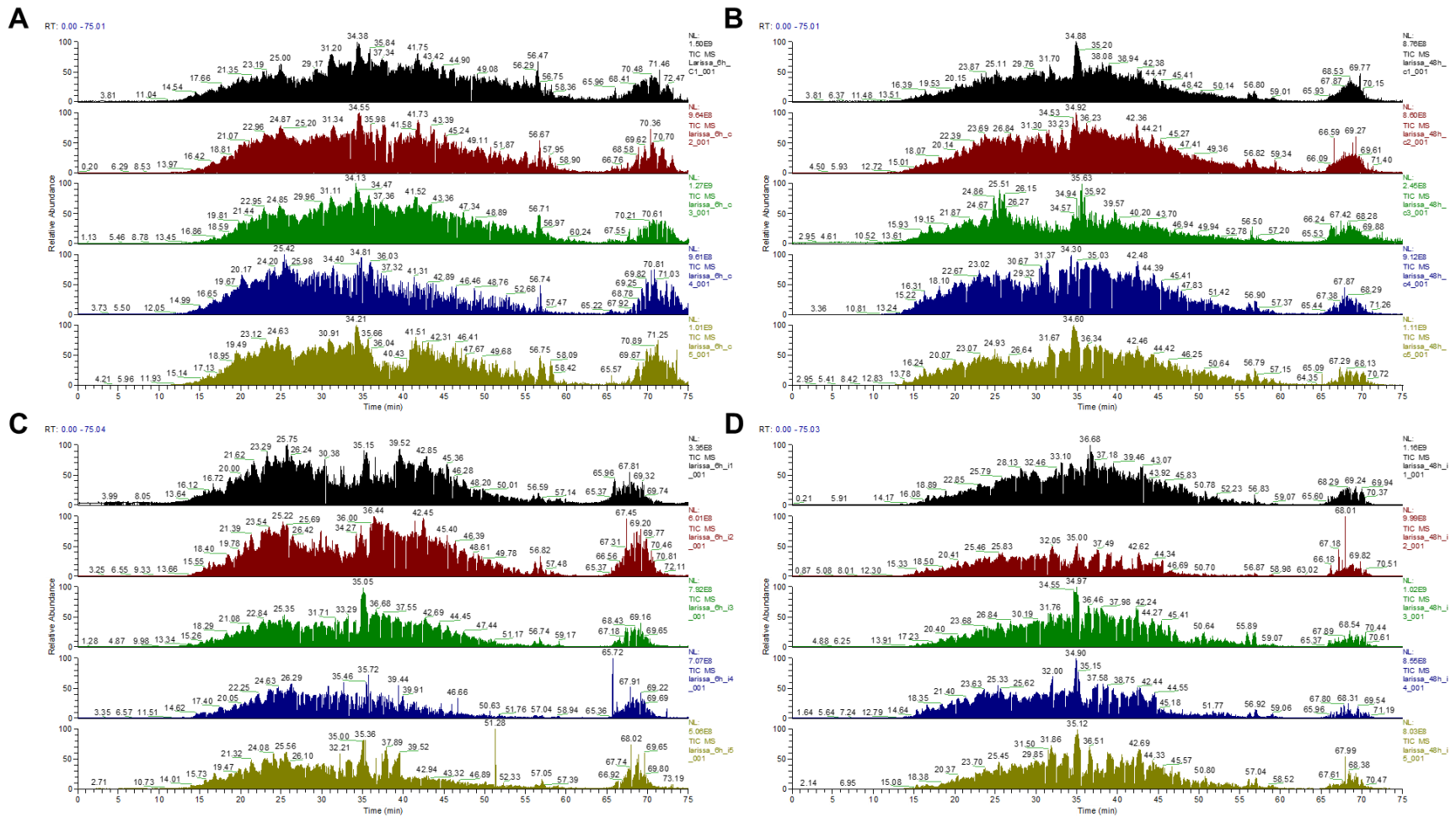
Como comparativo, o crescimento de *R. rickettsii* foi avaliado em células HMEC-1, uma linhagem celular microvascular endotelial humana (Figura 4). Uma curva de crescimento similar àquela observada na linhagem BME26 (Figura 2) foi observada, apresentando um tempo de duplicação de 7,2 h. Esses resultados demonstraram que a cepa Taiaçu de *R. rickettsii* é capaz de infectar de forma similar as duas linhagens celulares analisadas, sendo uma de carrapatos e outra de humanos, dando respaldo ao uso de cultivos celulares para o estudo da interação entre riquétsias e seus vetores, bem como para o estudo entre riquétsias e hospedeiros vertebrados.



**Figura 4. Curva de crescimento de *R. rickettsii* em células endoteliais humanas HMEC-1.** Células HMEC-1 foram inoculadas com *R. rickettsii* (MOI =10) e o número de bactérias após 6, 24, 48, 72, 96 e 120 h foi determinado por qPCR utilizando sonda TaqMan e oligonucleotídeos específicos para o gene *gltA* de *R. rickettsii*.

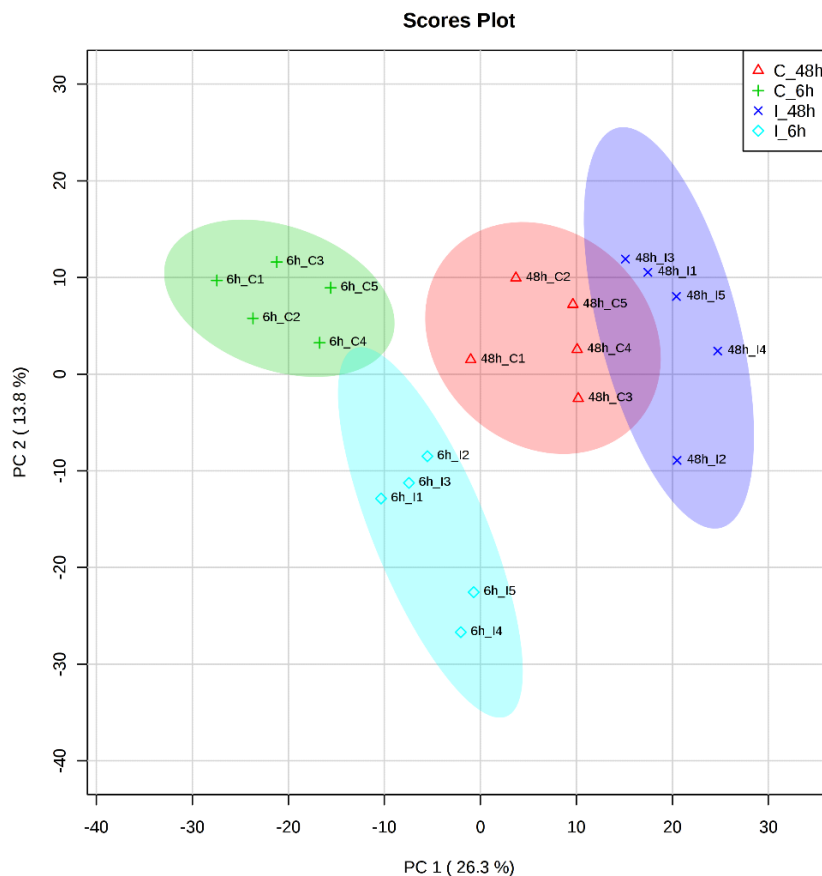
#### 4.2. Proteoma diferencial de células BME26 infectadas por *R. rickettsii*

Para a determinação do proteoma diferencial de células BME26 em resposta à infecção por *R. rickettsii*, selecionamos um ponto inicial da infecção (6 h) e outro na fase exponencial de crescimento bacteriano (48 h). As proteínas extraídas de cinco réplicas biológicas de células BME26 não infectadas (controle) ou infectadas por *R. rickettsii* em cada um dos dois tempos de infecção foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina e os fragmentos trípticos resultantes (peptídeos) foram analisados por LC-MS/MS. Peptídeos foram detectados ao longo de toda a cromatografia de cada uma das réplicas biológicas, demonstrando uma alta taxa de cobertura das análises (**Figura 5**).



**Figura 5. Perfis cromatográficos dos peptídeos resultantes do tratamento de proteínas extraídas de células BME26 (fragmentos trípticos) infectadas ou não por *R. rickettsii* por LC-MS/MS. Os peptídeos de cada uma das cinco réplicas biológicas das amostras controle [tempos 6 h (A) e 48 h (B)] e das amostras infectadas [tempos 6 h (C) e 48 h (D)] foram individualmente separados em coluna analítica EASY-Column acoplada a um nano-HPLC. Para a eluição dos peptídeos foi utilizado um gradiente de 0 a 35% acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico em 75 min e fluxo de 300 nL/min. A abundância relativa dos íons foi determinada utilizando-se um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos acoplado ao HPLC.**

A análise de componentes principais [PCA (**Figura 6**)] dos dados de LC-MS/MS demonstrou uma separação clara entre os conjuntos de dados obtidos das réplicas biológicas de células BME26 nos tempos de 6 h em relação ao tempo de 48 h. Além disso, foi possível observar uma separação entre os dados da condição controle e infectada em cada um dos tempos analisados, embora tenha sido observado uma maior sobreposição de dados no tempo de 48 h.

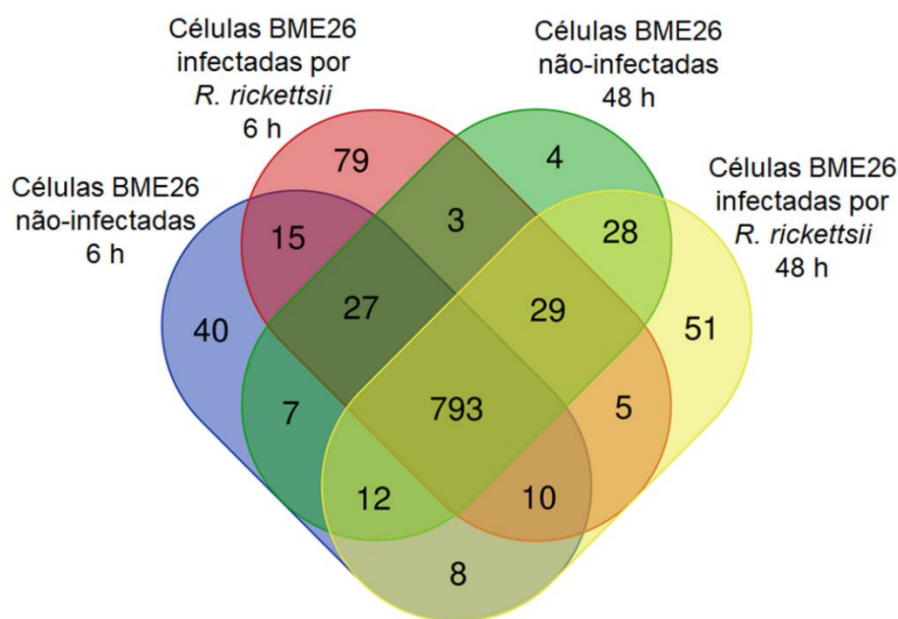


**Figura 6. PCA dos proteomas de células BME26 não infectadas (controle) ou infectadas por *R. rickettsii*.** Os proteomas de células BME26 não infectadas (controle; C\_6h e C\_48h) ou infectadas por *R. rickettsii* (I\_6h e I\_48h), obtidos por LC-MS/MS, foram submetidos a uma análise de componentes principais. PC1, *principal component 1*; PC2, *principal component 2*.

Apesar da PCA não ter evidenciado nenhuma réplica biológica discrepante (*outlier*), as células infectadas do tempo de 6 h apresentaram um número total de proteínas exclusivamente detectadas (246 proteínas) maior que o número total de proteínas exclusivas nas demais condições analisadas (células controle - tempo 6h: 40 proteínas; células controle - tempo 48 h: 4 proteínas e células infectadas - tempo

48 h: 51 proteínas). A análise individual de cada réplica biológica mostrou que uma das réplicas de células infectadas do tempo de 6 h (I5) apresentava 169 proteínas exclusivas, enquanto as demais réplicas deste grupo apresentavam entre oito e 41 proteínas exclusivas. Com isso, a réplica I5 foi considerada *outlier* e excluída das análises subsequentes.

Os dados obtidos por LC-MS/MS foram analisados pelo programa MaxQuant contra um banco de dados contendo sequências de aminoácidos deduzidas de transcritos de células BME26 e de sequências de bactérias do gênero *Rickettsia*. Um total de 1.119 proteínas foram identificadas, das quais 1.111 correspondem a proteínas de carrapatos (**Tabelas suplementares 1 a 6**) e oito a proteínas de bactérias do gênero *Rickettsia* (**Tabela suplementar 7**), as quais foram excluídas das análises subsequentes. Dentre as proteínas de carrapatos, 793 proteínas foram observadas em todas as condições analisadas (**Figura 7**).

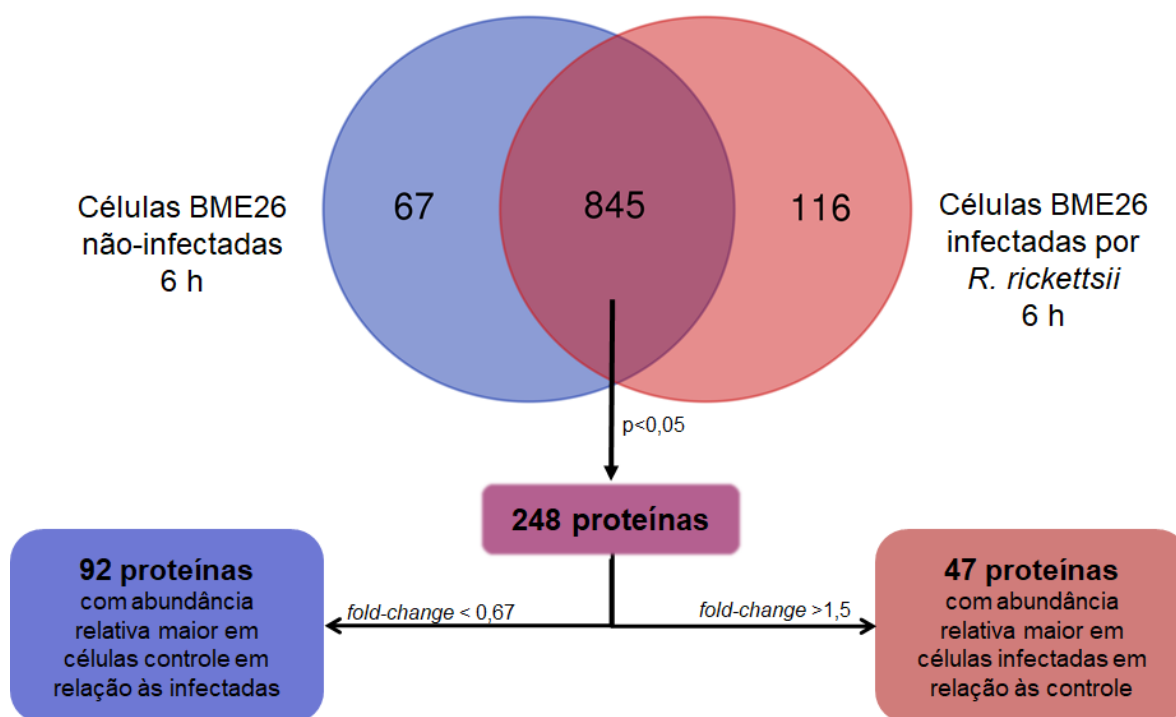


**Figura 7.** Número total de proteínas de carrapatos identificadas por LC-MS/MS em células BME26 não infectadas (controle) ou infectadas por *R. rickettsii* por 6 h e 48 h.

Na análise do ponto de 6 h (**Figura 8**), 845 proteínas comuns às células não infectadas (controle) e infectadas por *R. rickettsii* foram identificadas. Dentre essas proteínas, 47 apresentam abundância relativa maior nas células infectadas em



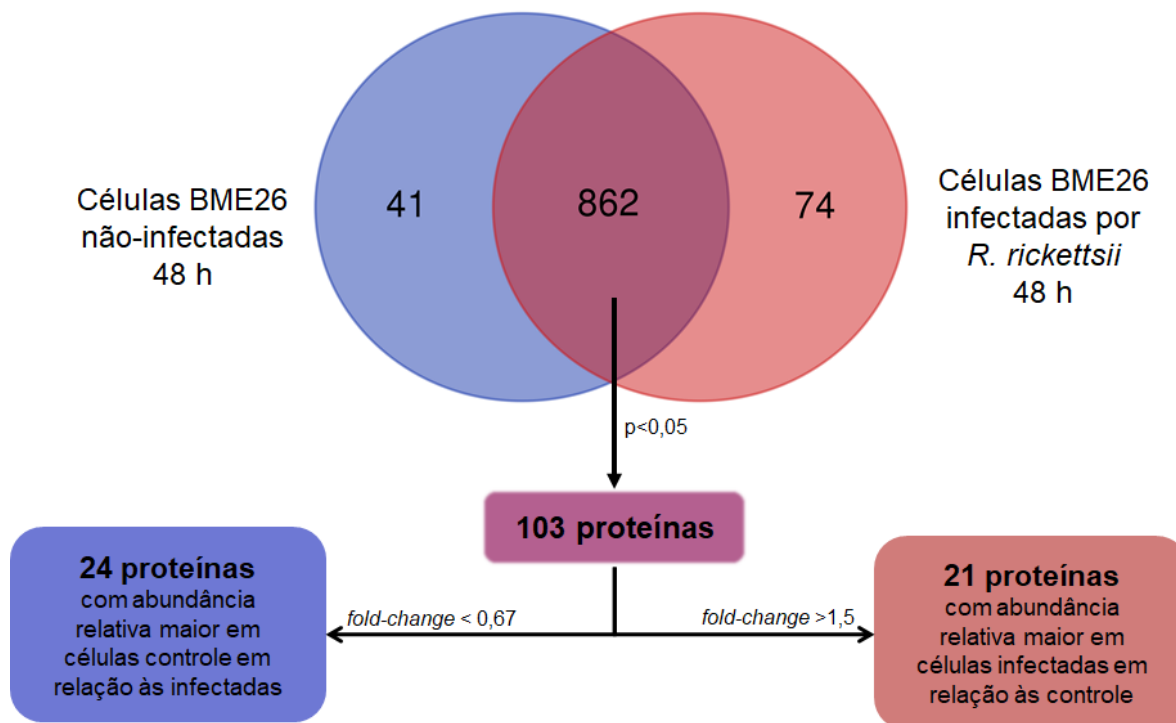
relação ao controle ( $p < 0,05$  e razão  $\geq 1,5$ ) e 92 apresentam abundância relativa maior nas células do controle em relação às infectadas ( $p < 0,05$  e razão  $\leq 0,67$ ) (**Tabela Suplementar 1**). As demais proteínas que apresentaram abundância relativa com diferenças significativas em células infectadas em relação ao controle mas que tiveram razão  $< 1,5$  e  $> 0,67$  não foram consideradas moduladas. Sessenta e sete proteínas foram identificadas exclusivamente nas amostras de células controle (**Tabela Suplementar 2**) e 116 exclusivamente nas amostras de células infectadas por *R. rickettsii* (**Tabela Suplementar 3**). Assim, em 6 h, um total de 163 proteínas foram induzidas por *R. rickettsii* (considerando-se as proteínas com abundância relativa maior nas células BME26 infectadas ou identificadas exclusivamente nessa condição) e 159 foram reprimidas (considerando-se as proteínas com abundância relativa maior nas células BME26 controle ou identificadas exclusivamente nessa condição).



**Figura 8.** Número de proteínas de células BME26 identificadas por LC-MS/MS e moduladas por *R. rickettsii* após 6 h de infecção.

Em relação ao ponto de 48 h (**Figura 9**), identificamos um total de 862 proteínas em comum nas células controle e infectadas. Dentre essas proteínas, 21

apresentaram abundância relativa maior em células infectadas por *R. rickettsii* e 24 apresentaram abundância relativa maior em células não infectadas (**Tabela Suplementar 4**). Da mesma forma que anteriormente descrito para as proteínas identificadas no ponto de 6 h, as demais proteínas que apresentaram abundância relativa com diferenças significativas em células infectadas em relação ao controle mas que tiveram razão  $< 1,5$  e  $> 0,67$  não foram consideradas moduladas. Foram identificadas 41 proteínas exclusivamente nas células controle (**Tabela Suplementar 5**) e 74 proteínas nas células infectadas (**Tabela Suplementar 6**). Dessa maneira, no tempo de 48 h, um total de 95 proteínas foram induzidas pela infecção por *R. rickettsii* e 65 foram reprimidas.

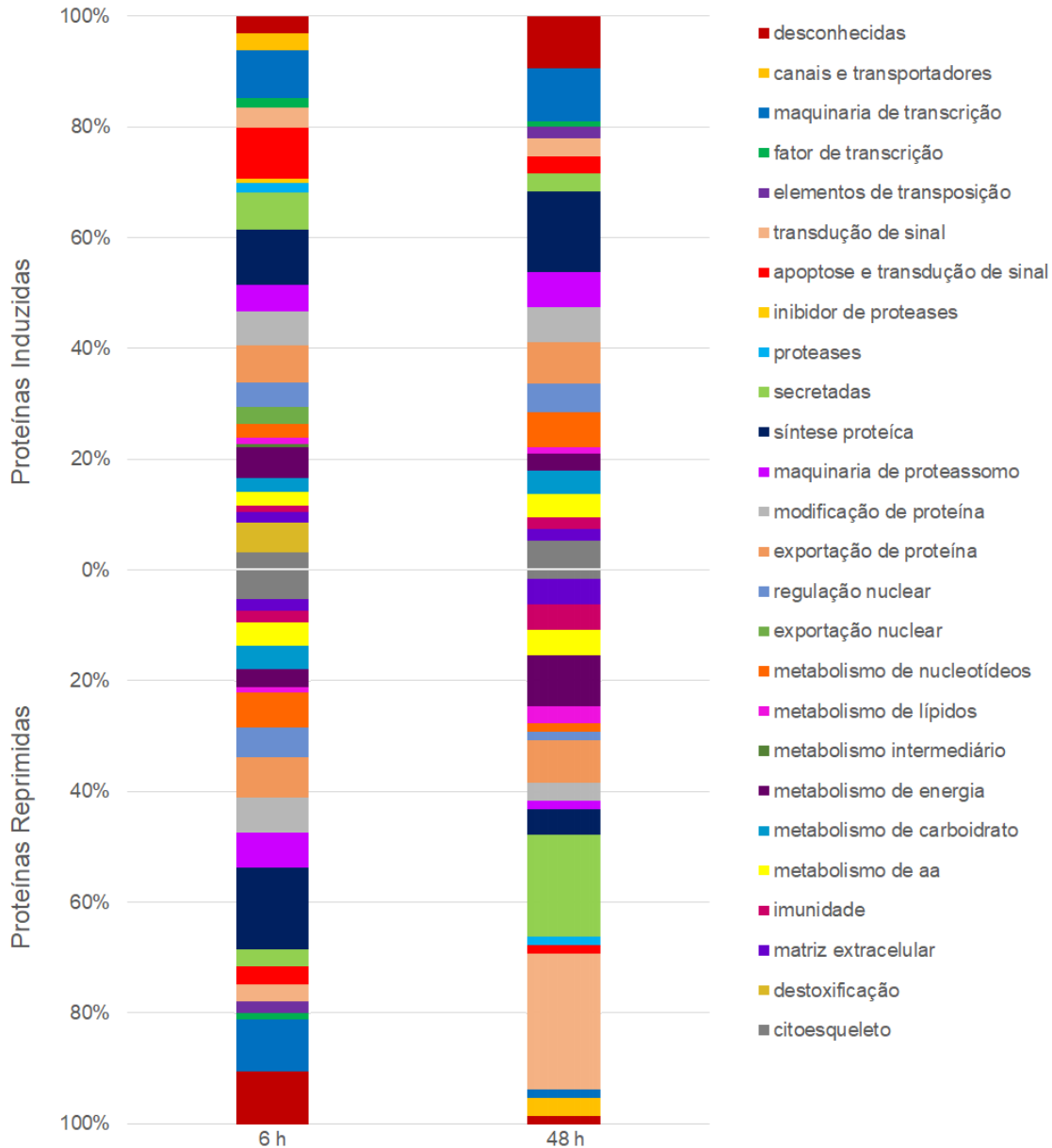


**Figura 9.** Número de proteínas de células BME26 identificadas por LC-MS/MS e moduladas por *R. rickettsii* após 48 h de infecção.

As proteínas identificadas foram classificadas funcionalmente conforme descrito por Karim e colaboradores (2011). As categorias de maquinaria de transcrição e síntese proteica incluem a maior parte das proteínas induzidas pela infecção em ambos os tempos de infecção (**Figura 10**). As classes de metabolismo

de nucleotídeos, regulação nuclear, exportação e modificação de proteínas e maquinaria de proteassomo também representam proteínas induzidas em ambos os tempos de infecção. Por outro lado, proteínas induzidas nas classes de canais e transportadores, inibidores de proteases, proteases, exportação nuclear, destoxificação e metabolismo intermediário foram observadas apenas no tempo de 6 h, enquanto proteínas induzidas na classe de elementos de transposição foram detectadas apenas no tempo de 48 h (**Figura 10**). A classe funcional de apoptose/transdução de sinal também engloba grande parte das proteínas induzidas pela infecção, com um número maior de proteínas no tempo de 6 h comparado ao tempo de 48 h (**Figura 10 e Tabela 3**).

Em relação às classes funcionais de proteínas reprimidas pela infecção (**Figura 10**), no tempo de 6 h as proteínas concentram-se principalmente nas categorias de maquinaria de transcrição, síntese, exportação e modificação de proteínas e maquinaria de proteassomo. No ponto de 48 h, um número menor de proteínas reprimidas nessas mesmas classes funcionais foi obtido. Já as proteínas englobadas nas classes de metabolismo de energia, transdução de sinal e de proteínas secretadas apresentam maior número de proteínas reprimidas no tempo de 48 h comparado ao tempo de 6 h (**Figura 10**). Proteínas reprimidas nas classes de fatores de transcrição e elementos de transposição foram observadas apenas no tempo de 6 h. Por outro lado, proteínas dentro dessas mesmas classes funcionais foram observadas como induzidas apenas no ponto de 48 h. Já proteínas reprimidas nas classes de canais e transportadores e proteases foram observadas apenas no tempo de 48 h, as quais, todavia, foram induzidas apenas no tempo de 6 h (**Figura 10**).



**Figura 10. Classificação funcional de proteínas de células BME26 induzidas e reprimidas pela infecção por *R. rickettsii* nos pontos de 6 e 48 h.**

Dentre as proteínas moduladas em resposta à infecção por *R. rickettsii*, destacam-se aquelas relacionadas à apoptose e transdução de sinal, maquinaria de proteassomo e citoesqueleto, as quais foram induzidas (**Tabela 3**) ou reprimidas (**Tabela 4**) de acordo com o tempo analisado.

**Tabela 3. Seleção de proteínas de células BME26 que foram induzidas após 6 e 48 h da infecção por *R. rickettsii*.**

Classe Funcional	6 h		48 h	
<b>Apoptose e Transdução de sinal</b>	BME26USP-64008	Indutor de condensação de cromatina apoptótica no núcleo	BME26USP-3827	Mucina-1 - regulação negativa da via intrínseca de sinalização de apoptose em resposta a dano ao DNA por mediador da classe 53
			BME26USP-77602	- Grupo D2 de complementação da anemia de Fanconi - regulação negativa do processo apoptótico
			BME26USP-73913	Inibidor de apoptose induzida por citocina 1
<b>Maquinaria de proteassomo</b>	BME26USP-3792	Ubiquitina pequena, relacionada à modificadora 3	BME26USP-63775	Complexo regulador de proteassomo 26S - subunidade RPN11
	BME26USP-1981	Subunidade reguladora tipo alfa de proteassomo 20S - PSMA5/PUP2	BME26USP-4899	Subunidade reguladora tipo beta de proteassomo 20S - PSMB1/PRE7
	BME26USP-61379	Complexo regulador de proteassomo 26S - subunidade RPN12/PSMD8		
	BME26USP-61464	Complexo regulador de proteassomo 26S - ATPase RPT5	BME26USP-SigP-64474	Complexo regulador de proteassomo 26S - subunidade RPN2/PSMD1
	BME26USP-62756	Proteína reguladora da ubiquitina	BME26USP-66020	Proteína-ubiquitina ligase
	BME26USP-63407	Inibidor de proteassomo		
	BME26USP-67891	Complexo regulador de proteassomo 26S - subunidade RPN7/PSMD6		
	BME26USP-70300	Complexo regulador de proteassomo 26S - subunidade RPN5/PSMD12	BME26USP-68301	Subunidade reguladora tipo alfa de proteassomo 20S - PSMA1/PRE5
<b>Citoesqueleto</b>	BME26USP-SigP-75480	Receptor tirosina proteína quinase TIE-1	BME26USP-2996	Proteína parcial associada a microtúbulos
	BME26USP-26177	Proteína Ca <sup>2+</sup> ligante de agregação de actina (Espectrina) - cadeia alfa	BME26USP-5135	Tropomodulina e leiomodulina
	BME26USP-71952	Proteína relacionada à actina - complexo Arp2/3 - subunidade Arpc5	BME26USP-65063	Substrato Src de cortactina
	BME26USP-4511	Proteína predita de agregação de actina	BME26USP-42758	Vinculina - morfogênese da projeção de neurônios - fagocitose - citoesqueleto de actina - molécula estrutural - ligação A actina - ancoragem do citoesqueleto
	BME26USP-71823	Proteína de ligação a microtúbulos		
	BME26USP-51361	Complexo de kinesina - motor de microtúbulos	BME26USP-69366	Tubulina alfa

**Tabela 4. Seleção de proteínas de células BME26 que foram reprimidas após 6 e 48 h da infecção por *R. rickettsii*.**

Classe Funcional	6 h		48 h			
<b>Apoptose e Transdução de sinal</b>	BME26USP-4263	Proteína de ligação ao ativador CDK5	BME26USP-3889	Indutor de condensação de cromatina apoptótico - Acinus		
	BME26USP-3827	Mucina-1 - regulação negativa da via intrínscica de sinalização de apoptose em resposta a dano ao DNA por mediador da classe 53				
	BME26USP-65523	Inibidor da apoptose 5 / fator de crescimento de fibroblastos fator 2				
	BME26USP-74870	Proteína de montagem de clathrina AP180				
	BME26USP-4568	Ubiquinona oxidoreductase subunidade b16.6 / proteína parcial de morte celular				
<b>Maquinaria de proteassomo</b>	BME26USP-65609	Subunidade reguladora tipo beta de proteassomo 20S - PSMB4/PRE4	BME26USP-65272	Componente SCP ubiquitina ligase Skp1		
	BME26USP-64301	Complexo regulador de proteassomo 26S - ATPase RPT6				
	BME26USP-75557	Subunidade reguladora tipo alfa de proteassomo 20S - PSMA2/PRE8				
	BME26USP-23398	Hidrolase C-terminal de ubiquina				
	BME26USP-4899	Subunidade reguladora tipo beta de proteassoma 20S - PSMB1 / PRE7				
	BME26USP-77519	Subunidade reguladora de proteassomo 20S - RPN10/PSMD4				
	BME26USP-23319	Protease Lon dependente de ATP				
<b>Citoesqueleto</b>	BME26USP-75222	Alfa tubulina	BME26USP-26191	Proteína tirosina quinase		
	BME26USP-71918	Proteína relacionada à actina - complexo Arp2/3 - subunidade Arp2				
	BME26USP-62031	Proteína homóloga Cdc42 - regulação positiva da proteína quinase - manutenção da localização da proteína - junção aderente - função molecular				
	BME26USP-2688	Inibidor da dissociação do GDP - complexo associado aos microtúbulos - transporte de proteínas - Rab inibidor da dissociação do GDP - vesícula sináptica				
	BME26USP-4897	Proteína relacionada à actina - complexo Arp2/3 - subunidade ARPC1 / p41-ARC			BME26USP-SigP-76633	Tirosina quinase da família de receptores de ephrina
	BME26USP-25990	Cadeia intermediária leve de dineína				
	BME26USP-62954	Proteína do músculo esquelético regulada por estiramento				
	BME26USP-77773	Fator de reticulação de microtúbulo-actina 1				

Em relação às proteínas envolvidas no processo apoptótico, uma proteína indutora de condensação de cromatina apoptótica no núcleo foi induzida no ponto de 6 h (**Tabela 3**), enquanto proteínas de regulação negativa de apoptose, como, por exemplo, a mucina-1 (regulação negativa da via intrínseca de sinalização de apoptose em resposta a dano ao DNA por mediador da classe 53), foram reprimidas (**Tabela 4**). Já após 48 h, proteínas de regulação negativa de apoptose, incluindo a mucina-1, foram induzidas (**Tabela 3**), enquanto uma outra proteína indutora de condensação de cromatina apoptótica foi reprimida (**Tabela 4**). Em relação às proteínas na classe de maquinaria de proteassomo, diversos componentes regulatórios das subunidades 20S e 26S do proteassomo foram induzidos (**Tabela 3**) ou reprimidos (**Tabela 4**) no tempo de 6 h. Além disso, um inibidor de proteassomo, um modificador de ubiquitina e uma proteína regulatória de ubiquitina foram induzidos nesse tempo (**Tabela 3**), enquanto uma hidrolase C-terminal de ubiquitina e uma protease Lon dependente de ATP foram reprimidas (**Tabela 4**). Um número menor de proteínas envolvidas com proteassomo foram modulados no tempo de 48 h, das quais uma ubiquitina ligase foi induzida (**Tabela 3**), enquanto o componente SCF ubiquitina ligase Skp1 foi reprimido (**Tabela 4**). Em relação aos componentes de citoesqueleto e actina, as subunidades 2 e ARPC1/p41-ARC do complexo Arp2/3 foram reprimidas em 6 h (**Tabela 4**). Já a subunidade ARPC5 do mesmo complexo e duas proteínas de ligação à actina, incluindo uma espectrina, foram induzidas (**Tabela 3**).

#### **4.3. Determinação dos efeitos do silenciamento das CDSs de proteínas moduladas pela infecção sobre a proliferação de *R. rickettsii* em células BME26**

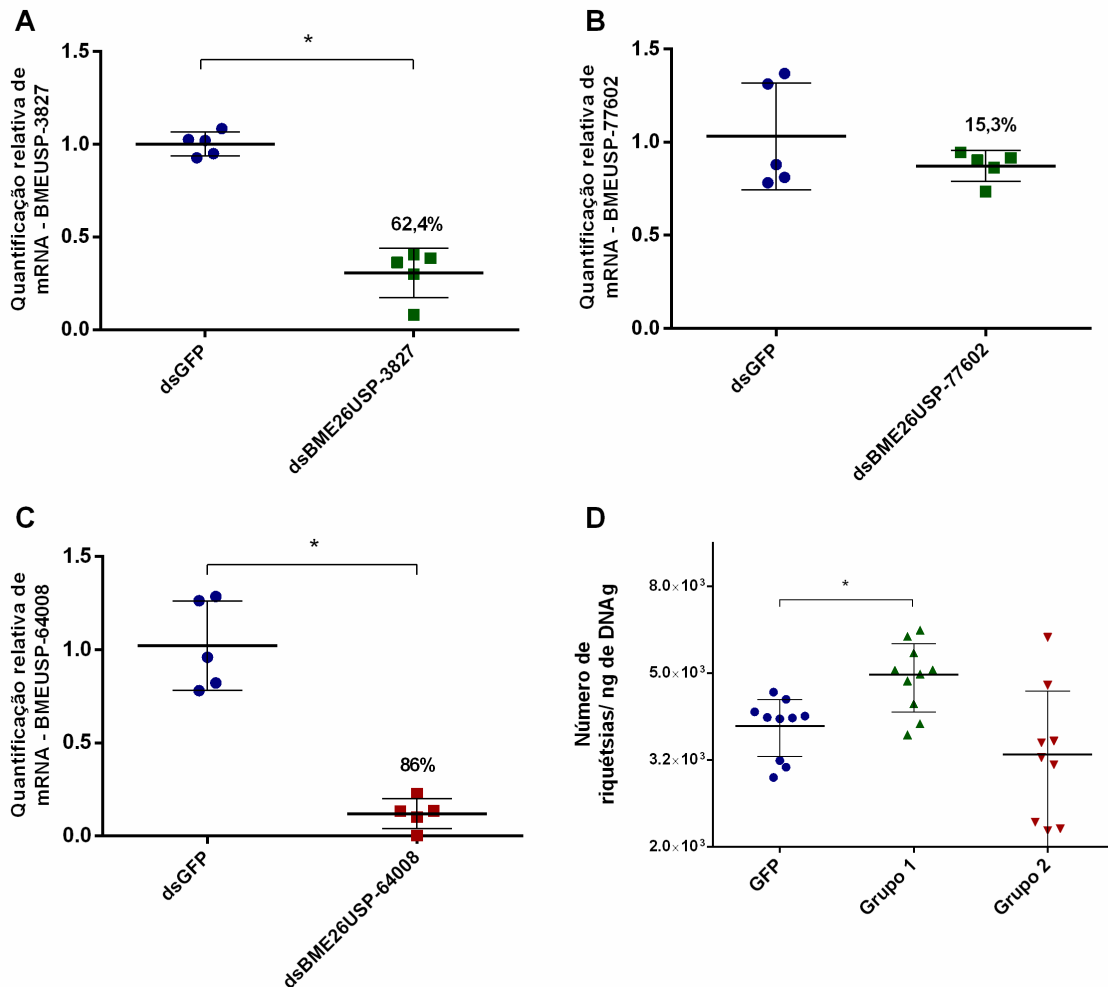
Primeiramente, avaliamos os efeitos do silenciamento de algumas CDSs de proteínas identificadas como moduladas pela infecção relacionadas à apoptose (**Tabela 5**) sobre a proliferação de *R. rickettsii* em células BME26 (**Figura 11**). Para tal, células foram tratadas com dsRNA para duas proteínas com função de inibição de apoptose (Grupo 1), com a proteína indutora de cromatina apoptótica no núcleo (Grupo 2) ou com dsGFP (controle).

**Tabela 5. CDSs de proteínas selecionadas para o silenciamento por RNAi.**

<b>Grupo 1</b>	BME26USP-3827	Mucina-1 - regulação negativa da via intrínseca de sinalização de apoptose em resposta a dano ao DNA por mediador da classe 53
	BME26USP-77602	Grupo D2 de complementação da anemia de Fanconi - regulação negativa do processo apoptótico
<b>Grupo 2</b>	BME26USP-64008	Indutor de condensação de cromatina apoptótica no núcleo
<b>Controle</b>	GFP	

Confirmamos que o nível de transcritos da CDS da proteína BME26USP-3827 foi menor que no grupo controle (dsGFP), tendo ocorrido uma redução significativa de 62% (**Figura 11A**). A redução dos níveis dos transcritos da CDS da proteína BME26USP-77602 foi de apenas 15%, a qual não foi significativa (**Figura 11B**). O nível de transcritos do indutor de condensação de cromatina apoptótica no núcleo (BME26USP-64008) também foi significativamente menor que no controle, com silenciamento de 86% (**Figura 11C**). O silenciamento da expressão das CDSs das proteínas do grupo 1 (reguladores negativos de apoptose) levou a um aumento do número de bactérias em relação ao controle, o qual, apesar de significativo, foi muito pequeno (**Figura 11**). Nenhum efeito sobre o crescimento bacteriano foi observado pelo silenciamento do nível de transcritos do indutor de condensação de cromatina apoptótica no núcleo (BME26USP-64008), apesar do seu nível pronunciado de silenciamento.





**Figura 11. Avaliação do silenciamento e quantificação de *R. rickettsii* em células BME26 tratadas com dsRNAs de proteínas moduladas pela infecção.** A expressão gênica das CDSs selecionadas para o silenciamento foi determinada usando RT-qPCR. A quantificação relativa dos níveis de mRNA de (A) BME26USP-3827, (B) BME26USP-77602 e (C) BME26USP em células BME26 foi determinada após incubação com dsRNAs para as proteínas descritas nos grupos 1 e 2 (Tabela 5) em comparação com células incubadas com dsRNA GFP (controle). O número de riquetsias (D) em células BME26 tratadas com dsRNAs dos grupos 1 e 2 ou com dsGFP (controle) foi determinado por qPCR com sonda TaqMan para o gene *gltA* de *Rickettsia* spp. \* $p < 0.05$

#### 4.4. Avaliação da apoptose em células BME26 frente a infecção por *R. rickettsii*

Para avaliar se a apoptose ocorre em células BME26 e se a infecção por *R. rickettsii*, de fato, ocasiona algum efeito sobre esse processo, analisamos o DNAg extraído de células BME26 não infectadas (controle) ou infectadas por 6, 24, 48, 72, 96 e 120 h (Figura 12). A fragmentação de DNAg, característica típica de células

em apoptose (Nagata 2000), foi observada a partir de 96 h apenas nas amostras de células BME26 não infectadas.

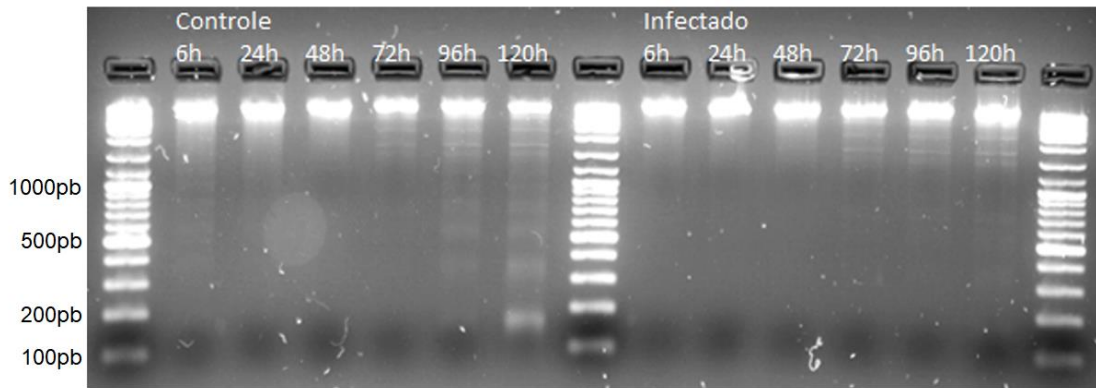


Figura 12. Avaliação de DNA de células BME26 não infectadas (controle) e após 6, 24, 48, 72, 96 e 120 h da infecção por *R. rickettsii* por eletroforese em gel de agarose.

Com o indicativo que a infecção controlava o processo apoptótico, iniciamos análises funcionais utilizando um ativador clássico da apoptose, a estaurosporina (Bertrand et al., 1994). Primeiramente foi realizado um ensaio de MTT para avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações estaurosporina sobre a linhagem celular BME26 (Figura 13).

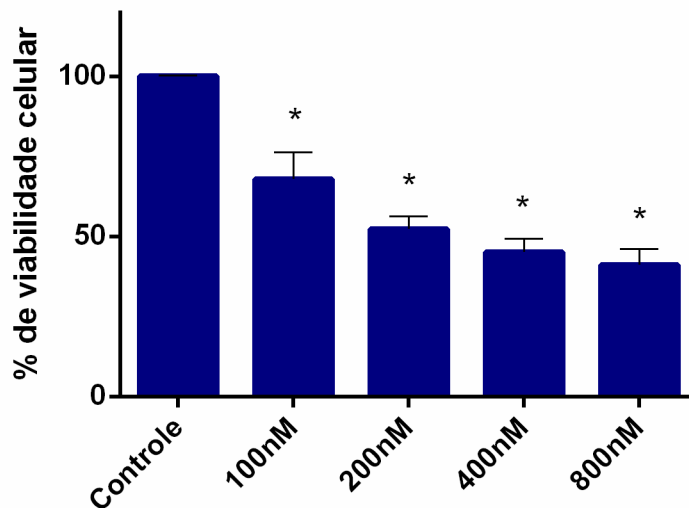
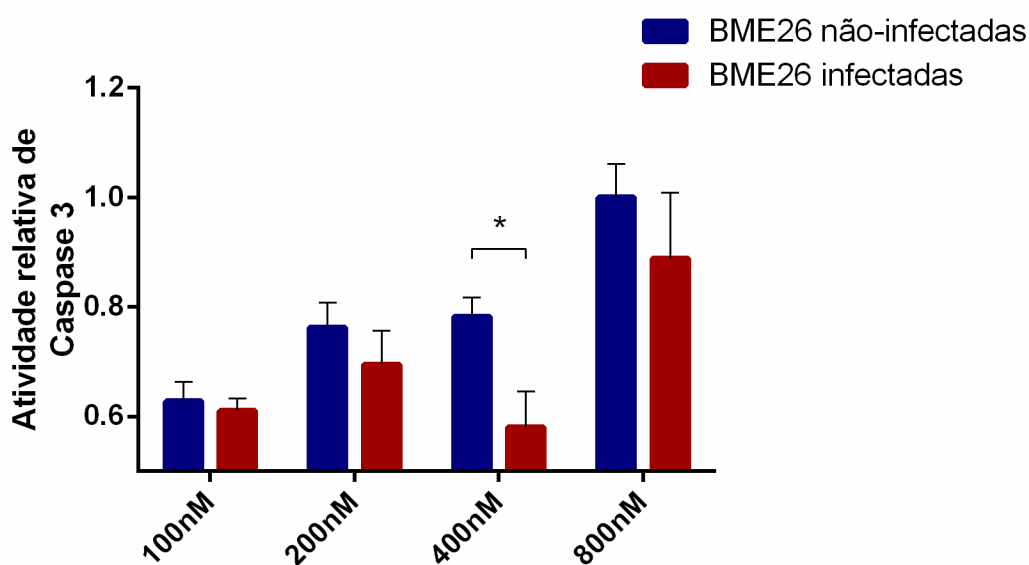


Figura 13. Efeitos de diferentes concentrações de estaurosporina sobre a viabilidade de células BME26. Células BME26 foram incubadas na ausência (controle) ou na presença de diferentes concentrações (100, 200, 400 e 800 nM) de estaurosporina. Após 120 h, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. A porcentagem de viabilidade celular representa a razão entre a  $Abs_{595/690nm}$  de células tratadas com as diferentes concentrações de estaurosporina e a  $Abs_{595/690nm}$  do controle x 100.

O ensaio mostrou que a estaurosporina age de maneira dose-dependente sobre a viabilidade das células BME26, sendo a menor viabilidade celular observada pelo tratamento com a maior concentração de estaurosporina (800 nM), na qual se obteve 41% de células viáveis.

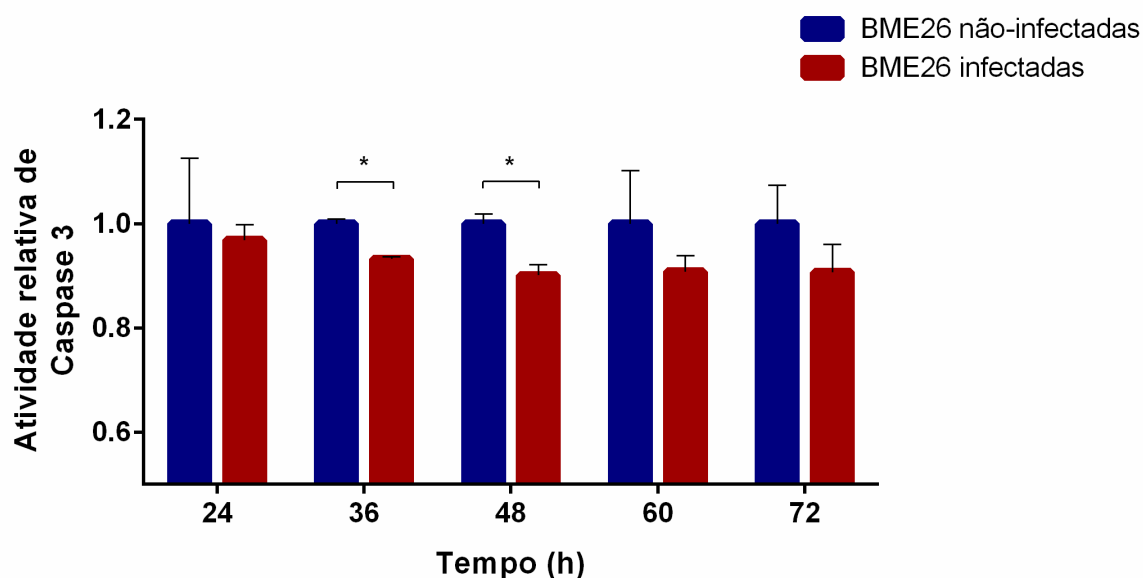
Para confirmar que a morte das células BME26 ocasionada pelo tratamento com estaurosporina era decorrente da indução de apoptose, a atividade de caspase-3, uma das caspases efetoras da apoptose (Nicholson 1999) foi avaliada a partir de sua cinética de hidrólise para o substrato específico (Ac-DEVD-AMC) (Figura 14 A e B).



**Figura 14. Avaliação da atividade de caspase-3 em células BME26 em resposta ao tratamento com diferentes concentrações de estaurosporina.** A atividade de caspase-3 em células BME26 não infectadas (controle) ou previamente infectadas por *R. rickettsii* por 48 h foi mensurada de acordo com a hidrólise do substrato fluorogênico sintético (Ac-DEVD-AMC). A atividade relativa de caspase-3 representa a razão entre o  $\Delta$ UAF (UAF 60 min - UAF 0 min) de cada condição em relação ao  $\Delta$ UAF de células não infectadas e tratadas com 800 nM de estaurosporina. \* $p < 0,05$ .

Os resultados obtidos demonstraram que a atividade da caspase-3 é induzida de modo dose-dependente por estaurosporina. Além disso, células previamente infectadas com *R. rickettsii* por 48 h apresentaram atividade de caspase-3 menor que células não infectadas, sendo essa redução significativa na concentração de 400 nM de estaurosporina. Dessa forma, essa concentração foi utilizada nos experimentos subsequentes.

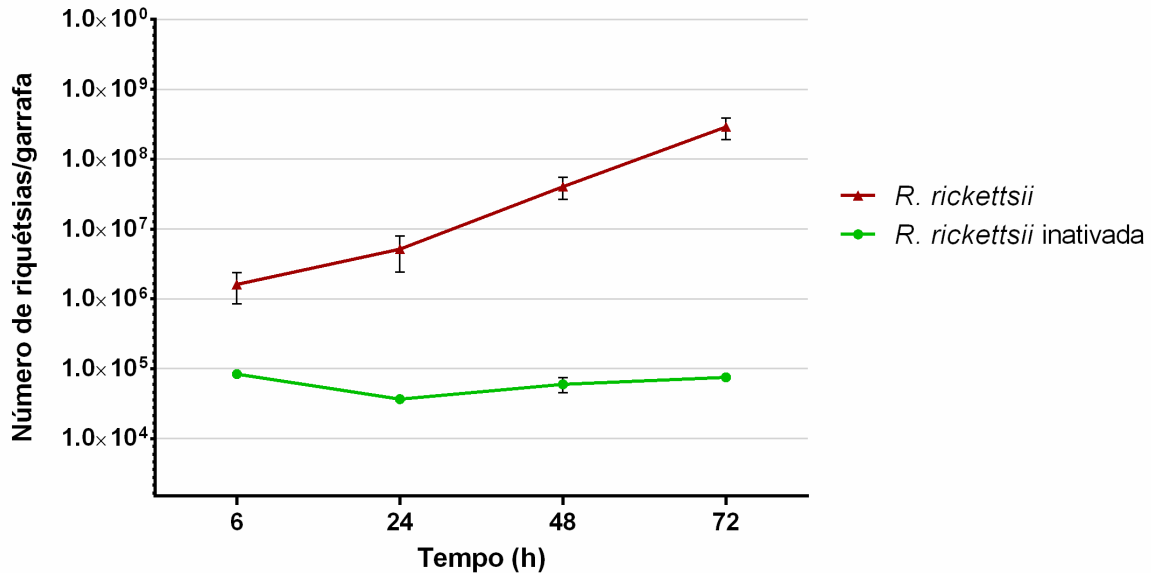
Para avaliar o tempo mínimo de infecção necessário para que *R. rickettsii* iniba a atividade da caspase-3 em células BME26, as mesmas foram previamente infectadas por 24, 36, 48, 60 e 72 h e, então, tratadas com estaurosporina (**Figura 15**). Como esperado, o tratamento com estaurosporina aumentou a atividade de caspase-3 em células não-infectadas e infectadas. Porém, a atividade da enzima foi significativamente menor nas células previamente infectadas por 36 e 48 h.



**Figura 15. Avaliação da atividade de caspase-3 em células BME26 não infectadas ou previamente infectadas por diferentes tempos com *R. rickettsii*.** Células não infectadas (controle) ou infectadas previamente com *R. rickettsii* por 24 h (A), 36 h (B), 48 h (C), 60 h (D) ou 72 h (E) foram tratadas com 400 nM de estaurosporina. A atividade de caspase-3 foi mensurada de acordo com a hidrólise do substrato sintético (ac-DEVD-AMC). A atividade relativa de caspase-3 representa a razão entre o  $\Delta$ UAF (UAF 60 min - UAF 0 min) de células infectadas em relação ao o  $\Delta$ UAF de células não-infectadas para cada tempo analisado. \* $p < 0.05$ .

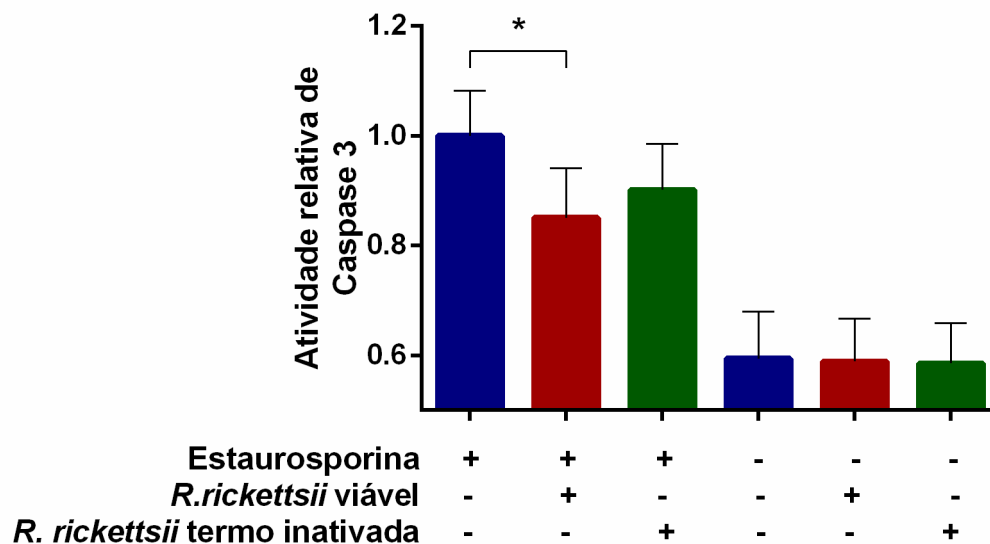
Para avaliar se a inibição da atividade da caspase-3 por *R. rickettsii* requisitava de componentes produzidos pela bactéria viva ou se era apenas uma resposta das células BME26 ao estímulo bacteriano, a atividade enzimática foi determinada em células expostas a *R. rickettsii* viáveis ou termo-inativadas. Primeiramente, avaliamos se o procedimento térmico adotado (1 h a 56°C) era suficiente para inativar *R. rickettsii*. As bactérias termo-inativadas foram inoculadas em células BME26 e não houve crescimento bacteriano até 72 h, confirmando a eficiência do procedimento (**Figura 16**). Por outro lado, o crescimento característico

de *R. rickettsii* foi observado em células BME26 inoculadas com riquetsias viáveis (não termo-inativada).



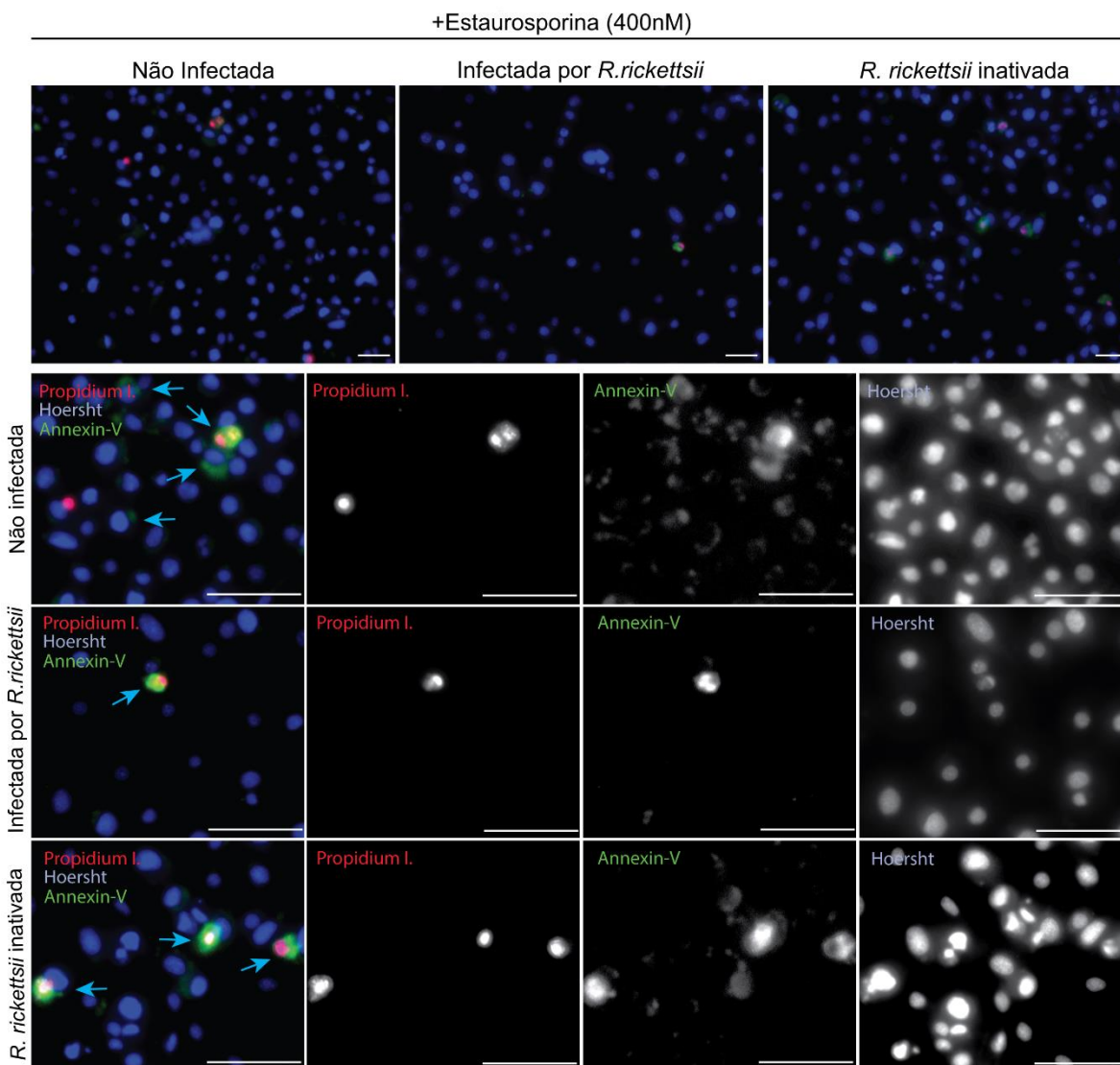
**Figura 16. Avaliação da eficiência da termo-inativação de *R. rickettsii* através do monitoramento do crescimento bacteriano em células BME26 por qPCR.** Células BME26 foram inoculadas com riquetsias termo-inativadas (linha verde) ou viáveis (linha vermelha) utilizando um MOI = 10 e o número de riquetsias após 6, 24, 48, e 72 h foi determinado por qPCR utilizando sonda TaqMan e oligonucleotídeos específicos para o gene *gltA* de *Rickettsia* spp.

Avaliamos, então, a atividade de caspase-3 em células BME26 estimuladas com *R. rickettsii* termo-inativadas (**Figura 17**). Apenas células infectadas com bactérias vivas apresentaram uma atividade enzimática significativamente menor em relação ao controle, enquanto a atividade em células estimuladas com bactérias termo-inativadas foi similar ao controle. Nenhuma diferença da atividade de caspase-3 foi observada entre os três grupos na ausência de estaurosporina.



**Figura 17. Avaliação da atividade de caspase-3 em células BME26 não infectadas ou inoculadas por 48 h com *R. rickettsii* viáveis ou termo-inativadas.** A atividade de caspase-3 em células BME26 não infectadas (controle) ou inoculadas com *R. rickettsii* viáveis ou termo-inativadas por 48 h, estimuladas ou não por estaurosporina (STA), foi determinada utilizando-se o substrato fluorogênico sintético ac-DEVD-AMC. A atividade relativa de caspase-3 representa a razão entre o  $\Delta$ UAF (UAF 60 min - UAF 0 min) de cada condição em relação ao  $\Delta$ UAF de células não-infectadas e tratadas com 400 nM de estaurosporina. \* $p < 0.05$

A translocação da fosfatidilserina da face interna ou citosólica da membrana plasmática para o lado externo das células é outra característica comum de células em apoptose (Fadok e Chimini, 2001; Segawa e Nagata, 2015). Assim, avaliamos a exposição de fosfatidilserina em células BME26 não infectadas, infectadas com *R. rickettsii* viáveis ou estimuladas com bactérias termo-inativadas. Para tal, as células foram marcadas com anexina V (para a marcação de fosfatidilserina exposta na superfície das células em apoptose; coloração verde), Hoechst (para identificar os núcleos celulares; coloração em azul) e iodeto de propídeo (PI; um marcador fluorescente utilizado para identificar células mortas; coloração vermelha) e observadas por microscopia de fluorescência (**Figura 18**).



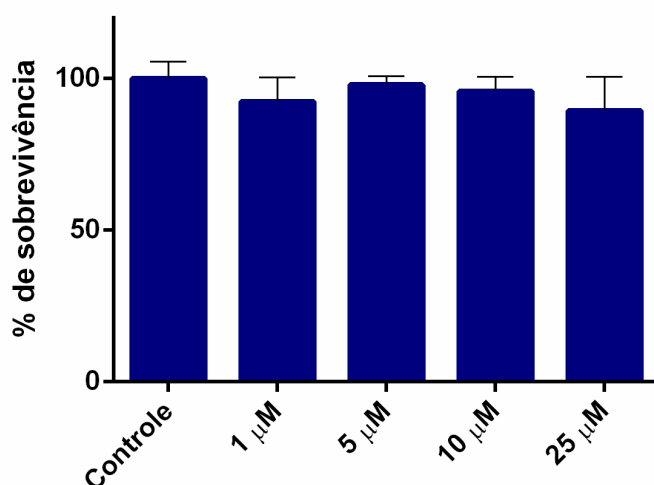
**Figura 18. Avaliação da exposição de fofatidilserina em células BME26 não infectadas ou estimuladas por 48 h com *R. rickettsii* viáveis ou termo-inativadas por microscopia de fluorescência.** As células inoculadas por 48 h com *R. rickettsii* viáveis (*R. rickettsii*), termo-inativadas (*R. rickettsii* inativada) ou células não infectadas (controle), foram previamente incubadas com estaurosporina 400nM e marcadas com Hoechst (azul; marcador nuclear), PI (vermelho; marcador de células mortas) e com Anexina V (verde; marcador de células em apoptose). O painel superior mostra uma visão geral do campo observado para cada uma das condições (controle, *R. rickettsii* ou *R. rickettsii* inativada) e o painel inferior apresenta um aumento da imagem com foco em um quadrante de cada condição dos painéis acima. Cada imagem em preto e branco representa o contraste para cada um dos corantes utilizados para cada uma das condições e as setas em azul mostram células em apoptose (marcadas com anexina V – verde).

Uma porcentagem menor de células marcadas com anexina V foi observada em células infectadas com *R. rickettsii* (12%) em relação ao controle (39%) e às células estimuladas com riquetsias termo-inativadas (20%). Esse resultado está de

acordo com os resultados previamente obtidos pela avaliação da atividade de caspase-3, a qual também é menor em células infectadas com riquetsias viáveis.

#### 4.5. Efeito da apoptose sobre a proliferação de *R. rickettsii* em células BME26

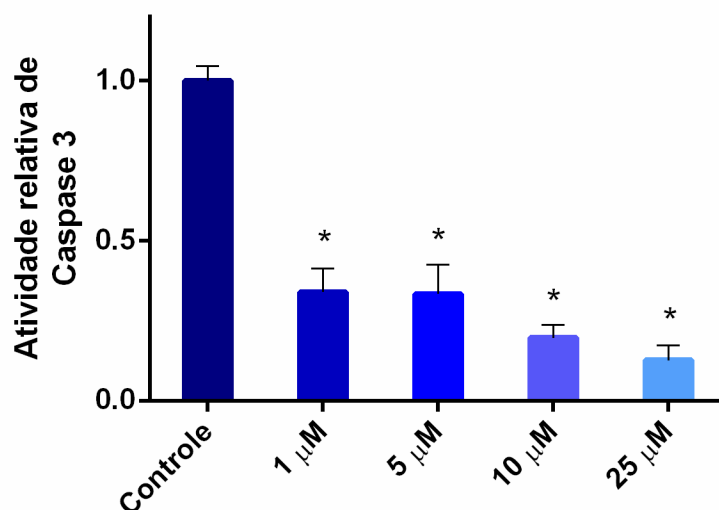
Para avaliar se a modulação da apoptose ocasionava algum efeito sobre o crescimento de *R. rickettsii* em células BME26, as células foram tratadas com estaurosporina ou com o inibidor de caspase-3 (Z-DEVD-Fmk) e, então, infectadas. Primeiramente, avaliamos a viabilidade de células BME26 frente a diferentes concentrações de Z-DEVD-Fmk (**Figura 19**). Não foram observados efeitos citotóxicos no período avaliado, sendo obtidas porcentagens de viabilidade celular próximas a 100% independentemente da concentração avaliada.



**Figura 19. Efeitos de diferentes concentrações de inibidor de caspase-3 (Z-DEVD-Fmk) sobre a viabilidade de células BME26.** Células BME26 foram incubadas na ausência (controle) ou na presença de diferentes concentrações (1, 5, 10 e 25 µM) de Z-DEVD-Fmk. Após 120 h, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. A porcentagem de viabilidade celular representa a razão entre a  $Ab_{S595/690nm}$  de células tratadas com as diferentes concentrações de Z-DEVD-Fmk e a  $Ab_{S595/690nm}$  do controle x 100.

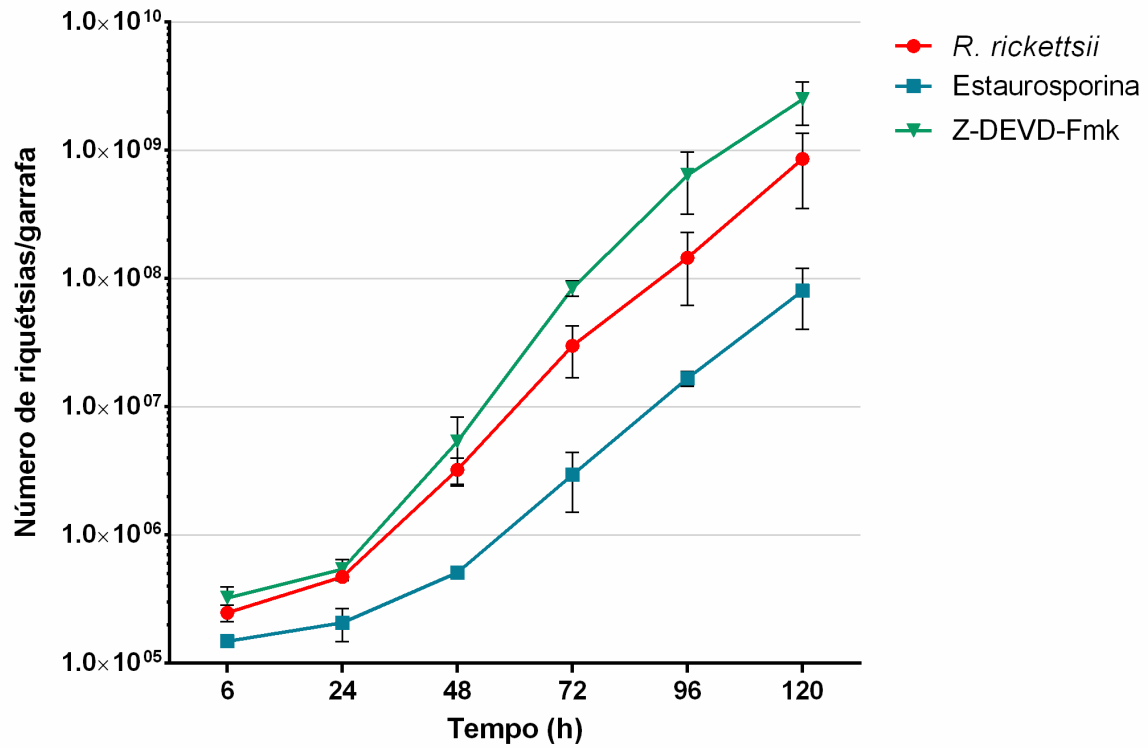
Em seguida, avaliamos a atividade de caspase-3 em células BME26 incubadas com Z-DEVD-Fmk nas mesmas concentrações utilizadas no ensaios de viabilidade celular (**Figura 20**). As concentrações de 25 µM e de 10 µM causaram a maior inibição da atividade de caspase-3.





**Figura 20. Avaliação da atividade de caspase-3 em células BME26 tratadas com diferentes concentrações de inibidor Z-DEVD-Fmk.** A atividade de caspase-3 em células BME26 foi determinada utilizando-se o substrato fluorogênico sintético ac-DEVD-AMC. A atividade relativa de caspase-3 representa a razão entre o  $\Delta$ UAF (UAF 60 min - UAF 0 min) de células tratadas com cada concentração de Z-DEVD-Fmk em relação ao  $\Delta$ UAF de células não tratadas (controle). \* $p < 0.05$

Dando continuidade aos ensaios, as células BME26 foram incubadas por 1 h com 400 nM de estaurosporina ou 10  $\mu$ M de inibidor de caspase-3 e, então infectadas, sendo a proliferação de *R. rickettsii* avaliada após 6, 24, 48, 72, 96 e 120 h (**Figura 21**). O crescimento bacteriano foi significativamente maior em células BME26 tratadas com o inibidor de caspase-3 do que em células não tratadas (controle) a partir de 72 h de infecção. Já a indução da apoptose com estaurosporina causou um impacto negativo na infecção, com a redução significativa do número de bactérias em relação ao controle já nas seis primeiras horas de infecção. Além disso, o tempo de duplicação de *R. rickettsii* em células não tratadas foi de 7,7 h, enquanto nas células tratadas com Z-DEVD-Fmk ou com estaurosporina os tempos de duplicação foram de 6,2 h e 11,3 h, respectivamente.



**Figura 21. Curva de crescimento de *R. rickettsii* em células BME26 na presença ou na ausência de estauosporina ou de inibidor Z-DEVD-Fmk.** O número de bactérias em células BME26 na presença ou na ausência de estauosporina (400 nM) ou de inibidor de caspase-3 (Z-DEVD-Fmk; 10µM) foi determinado por qPCR utilizando sonda TaqMan e oligonucleotídeos específicos para o gene *gltA* de *R. rickettsii*.

## 5. DISCUSSÃO

O hábito hematofágico dos carrapatos propicia o contato com uma enorme variedade de patógenos que podem estar presentes em seus hospedeiros vertebrados, os quais podem ser adquiridos e posteriormente transmitidos para hospedeiros saudáveis. De fato, carrapatos são vetores de diferentes tipos de patógenos, incluindo vírus, bactérias e protozoários, que podem ocasionar doenças graves a seres humanos e a outros animais (Sonenshine, 1991; de la Fuente, 2008; Nicholson et al., 2010; Dantas-Torres, Chomel e Otranto, 2012). Dentre as bactérias transmitidas por carrapatos, destacam-se as bactérias causadoras da Tularemia (gênero *Francisella*), erlichiose granulocítica humana (gênero *Ehrlichia*), doença de Lyme (gênero *Borrelia*), febre Q (gênero *Coxiella*), anaplasmoose granulocítica humana (gênero *Anaplasma*) e febres maculosas (gênero *Rickettsia*) (de la Fuente, 2008; Dantas-Torres, Chomel e Otranto, 2012; de la Fuente et al., 2017). Dentre as riquetsioses transmitidas por carrapatos, a RMSF (ou FMB), causada por *R. rickettsii*, é a mais severa, apresentando altos índices de caso-fatalidade (<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/zoonoses/febre-maculosa/dados-estatisticos>). No entanto, a profilaxia da doença é baseada exclusivamente na prática de se evitar o contato com os carrapatos vetores (Dantas-Torres, 2007). Nesse contexto, a elucidação dos mecanismos moleculares da interação de *R. rickettsii* com seus carrapatos vetores é fundamental para propiciar o desenvolvimento de novas estratégias tanto para o controle de carrapatos quanto para o bloqueio da transmissão do patógeno.

Embora nossa compreensão acerca das interações entre carrapatos e patógenos ainda seja limitada, o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas, tais como as linhagens celulares de carrapatos (Bell-Sakyi et al., 2007) e a metodologia de RNAi (Aljamali, Sauer e Essenberg, 2002; de la Fuente et al., 2005; de la Fuente, Kocan, et al., 2007; Kocan, Blouin e de la Fuente, 2011), propiciou um avanço no estudo das funções de proteínas de carrapatos. Esses avanços também foram facilitados ainda pelo crescente número de dados pós-genômicos disponibilizados em bancos públicos, incluindo dados de metabolômica,

transcriptômica e proteômica de várias espécies de carrapatos e de patógenos por eles transmitidos. Assim, é possível elucidar a função fisiológica de proteínas ou ainda determinar se são cruciais para a invasão e colonização do vetor pelo patógeno ou para a sua transmissão para o hospedeiro vertebrado.

A linhagem BME26 (células embrionárias do carrapato *R. microplus*) foi caracterizada celular e molecularmente por Esteves e colaboradores em 2008. Além disso, a infecção dessa linhagem celular por *B. burgdorferi* (Munderloh et al., 1993) e por *A. marginale* (Esteves et al., 2009) já foi reportada. Nosso grupo de pesquisa também demonstrou anteriormente que a linhagem BME26 é susceptível à *R. rickettsii*, tendo sido a primeira vez que uma cepa brasileira e altamente virulenta de *R. rickettsii* (cepa Taiapu) foi estabelecida em células de carrapato (Galletti, 2013 - Tese de Doutorado). A cepa Taiapu de *R. rickettsii* foi capaz de infectar as células BME26 em diferentes condições de pH, temperatura de incubação e MOI. Todavia, Galletti (2013) padronizou e utilizou o sistema de cultivo *in vitro* apenas para a obtenção de quantidades de material genético da bactéria *R. rickettsii* suficientes para a padronização de microarranjos de oligonucleotídeos. Após padronização, os microarranjos foram utilizados para a determinação do perfil transcricional global de *R. rickettsii* em órgãos de carrapatos *A. aureolatum* (Galletti et al., 2013; Galletti et al., 2016).

Apesar de estudos da interação entre patógenos e carrapatos *in vivo* serem importantes, eles representam um grande desafio. A obtenção do ciclo completo de carrapatos do gênero *Amblyomma* em laboratório leva de seis a oito meses (Pinter et al., 2004; Labruna et al., 2008; Soares et al., 2012; Labruna et al., 2011). Além disso, a obtenção de carrapatos em condições controladas e em quantidade suficiente para se realizar uma análise em diferentes tempos de infecção é um trabalho árduo, envolvendo o uso de muitos animais. Dessa forma, estabelecer uma linhagem celular como modelo para o estudo da interação carrapato-*R. rickettsii* é fundamental. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi utilizar a linhagem BME26 como modelo para o estudo da interação carrapato-*R. rickettsii*, determinando, para isso, o proteoma diferencial de células BME26 em resposta à

infecção por LC-MS/M. Esse é o primeiro estudo que relata os efeitos da infecção por *R. rickettsii* sobre o proteoma de carrapatos.

Primeiramente, a curva de crescimento da cepa Taiapu de *R. rickettsii* na linhagem BME26 foi determinada (**Figura 2**) e comparada com a curva de crescimento em uma linhagem celular microvascular endotelial humana (HMEC-1; **Figura 4**), uma vez que as células endoteliais são as células primárias de infecção de *R. rickettsii* em hospedeiros vertebrados (Walker, Firth e Edgell, 1982; Rydkina, Turpin e Sahni, 2010). *R. rickettsii* exibiu um perfil de crescimento semelhante em ambas as linhagens, com tempos de duplicação de 7,4 h (HMEC-1) e 8 h (BME26). Esses resultados demonstraram que a cepa Taiapu de *R. rickettsii* é capaz de infectar de forma similar tanto células de carrapatos quanto de humanos, dando respaldo ao uso de cultivos celulares para o estudo da interação entre riquétsias e seus vetores, bem como para o estudo entre riquétsias e hospedeiros vertebrados.

Com a curva de crescimento de *R. rickettsii* em células BME26 estabelecida, dois pontos, um na fase inicial da infecção (6 h) e outro ponto intermediário da fase logarítmica de crescimento (48 h), foram selecionados para a análise proteômica diferencial. Os dados obtidos por LC-MS/MS foram analisados contra um banco de dados de sequências de aminoácidos deduzidas de transcritos de células BME26 (dados obtidos por RNAseq e não publicados; gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Sirlei Daffre) e de sequências de bactérias do gênero *Rickettsia*. Um total de 1.119 proteínas foram identificadas, das quais 1.111 proteínas correspondem a proteínas de carrapato e apenas oito proteínas de riquétsias (**Figura 7**). Dentre as proteínas de riquétsias identificadas (**Tabela suplementar 7**), duas se destacam pelo seu papel durante a infecção de riquétsias a seus hospedeiros: a OmpB (*outer membrane protein B*) e a subunidade  $\alpha$  da ATP sintase. A OmpB está envolvida na aderência de riquétsias às suas células hospedeiras (Chan et al., 2009; Uchiyama, 2003). Já a subunidade da ATP sintase está envolvida com a geração de energia para a riquétsia via fosforilação oxidativa, que junto a outras proteínas de transporte adquire prótons do hospedeiro para sintetizar ATP (Renesto et al., 2005).

Dentre as proteínas de carrapatos, um total de 163 proteínas foram induzidas por *R. rickettsii* e 159 foram reprimidas no tempo de 6 h (**Figura 8**). Em 48 h, 95

proteínas foram induzidas pela infecção e 65 foram reprimidas (**Figura 9**). As proteínas de células BME26 moduladas pela infecção pertencem a diferentes classes (**Figura 10**). Diversas proteínas induzidas tanto no tempo de 6 h como de 48 h estão compreendidas nas classes de síntese proteica e maquinaria de transcrição (**Figura 10**). As classes de metabolismo de nucleotídeos, regulação nuclear, exportação e modificação de proteínas e maquinaria de proteassomo também incluem proteínas induzidas em ambos os tempos de infecção. Estudos anteriores apontam que os genomas de riquetsias, que são estritamente intracelulares, sofreram uma progressiva degradação cromossômica e plasmídial durante a evolução, resultando em uma redução do genoma para tamanhos próximos de 1,1 a 1,5 Mb (Diop, Raoult e Fournier, 2017). Essa redução genômica afetou principalmente genes associados ao metabolismo de ATP e de aminoácidos e biossíntese de LPS e de componentes da parede celular (Blanc et al., 2007; Renesto et al., 2005; Ogata et al., 2001). Desse modo, bactérias intracelulares precisam obter nutrientes e energia a partir de suas células hospedeiras, uma vez que essas vias foram perdidas ao longo da evolução. Assim, a indução de proteínas das classes funcionais transcrição e síntese de proteínas e maquinaria do proteassomo em células BME26 infectadas podem representar uma tentativa de *R. rickettsii* de adquirir aminoácidos livres. De fato, já foi reportado que a maquinaria de proteassomo é fundamental para prover aminoácidos necessários para a replicação *Legionella pneumophila*, uma bactéria intracelular como *R. rickettsii* (Price et al., 2011). No entanto, a infecção por *R. rickettsii* ocasionou a repressão de proteínas envolvidas com metabolismo energético em 48 h. A diminuição dos níveis de proteínas envolvidas com o metabolismo energético pode representar uma tentativa das células hospedeiras de limitar a disponibilidade de ATP para as bactérias, de modo a controlar sua proliferação.

Dentre as diversas proteínas que foram moduladas em células BME26 em resposta à infecção por *R. rickettsii*, destacam-se aquelas relacionadas ao citoesqueleto, maquinaria de proteassoma e apoptose (**Tabelas 3 e 4**). O citoesqueleto de actina é essencial em vários processos celulares, tais como comunicações célula-célula, interações célula-matriz e sinalização intracelular

(Dramsi e Cossart, 1998). Como as bactérias do gênero *Rickettsia* são desprovidas de estruturas de motilidade, tanto a movimentação intracelular quanto a saída de uma célula e invasão das células adjacentes envolvem a polimerização de actina da célula hospedeira. Essa polimerização é mediada pela proteína RickA de *Rickettsia*, a qual ativa o complexo Arp2/3 da célula hospedeira em um dos pólos da bactéria, propiciando a polimerização de actina e propulsionando a bactéria (Gouin et al., 2004; Jeng et al., 2004; Welch e Way, 2013). Em células eucarióticas, a actina existe em duas formas: actina monomérica globular e actina polimerizada filamentosa (Sultana et al., 2010). Sob condições normais, a actina globular prontamente polimeriza a actina filamentosa e a tendência da actina em formar filamentos depende da concentração crítica da actina das células (Hofmann e Lanerolle, 2006). A actina é um alvo comum de muitas proteínas bacterianas, e as respostas celulares induzidas por uma variedade de estímulos e patógenos envolvem mudanças na morfologia celular e no estado de polimerização da actina (Cameron et al., 2000; Gouin, Welch e Cossart, 2005; Stevens, Galyov e Stevens, 2006). Defeitos na capacidade de regular a dinâmica da actina provavelmente terão efeitos prejudiciais na função celular e, portanto, uma célula que perdeu a capacidade de se reorganizar irá sinalizar para a morte celular (Gourlay e Ayscough, 2005; Desouza, Gunning e Stehn, 2012). De fato, mais recentemente, a actina, assim como outras proteínas do citoesqueleto, vem sendo associada ao processo apoptótico (Franklin-Tong e Gourlay, 2008; Desouza, Gunning e Stehn, 2012).

O proteoma revelou também que diversos componentes da maquinaria do proteassomo são modulados no momento inicial da infecção (6h), com proteínas induzidas e reprimidas. Já no ponto de 48 h, a maioria das proteínas desse complexo foram induzidas (**Tabelas 3 e 4**). O sistema ubiquitina-proteassomo é a principal via não-lisossomal para a degradação de proteínas em eucariotos, sendo utilizado para eliminar proteínas danificadas ou aquelas com erros de síntese, as quais são marcadas para a degradação através da ligação de cadeias de ubiquitina (Lecker, 2006). Também já foi demonstrado que essa via proteolítica desempenha um papel importante na regulação da apoptose, uma vez que moléculas reguladoras são degradadas via proteassomo (Vucic, Dixit e Wertz, 2011; Severo et al., 2013;

Bader e Steller, 2009). Estudos prévios demonstraram que a inibição da apoptose pela infecção por *R. rickettsii* em células endoteliais humanas é dependente da ativação de um fator de transcrição NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B) (Clifton et al., 1998). No entanto, a inibição química do sistema proteassomo pelo inibidor MG 132 em células endoteliais leva à rápida morte celular, uma vez que impede a degradação do inibidor do NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente, o processo apoptótico não é inibido (Clifton et al., 1998). Também já foi reportado que a maquinaria ubiquitina-proteassoma é importante para a bactéria intracelular *Legionella pneumophila*, uma bactéria intracelular como *R. rickettsii*, gerando aminoácidos necessários para a replicação bacteriana (Price et al., 2011). Assim, é possível que o sistema ubiquitina-proteassomo esteja envolvido na regulação da apoptose em células BME26 infectadas, degradando reguladores negativos da apoptose, assim como ocorre em células endoteliais. Também é possível que *R. rickettsii* induza a expressão de componentes do proteassomo para gerar aminoácidos para a sua replicação, assim como *L. pneumophila*. Como mencionado anteriormente, a redução do genoma de riquetsias afetou genes associados ao metabolismo de aminoácidos (Renesto et al., 2005), de forma que a bactéria precisa captar diversos aminoácidos de suas células hospedeiras.

Em relação a proteínas envolvidas com apoptose, uma proteína indutora de condensação de cromatina apoptótica no núcleo foi induzida ponto de 6 h (**Tabela 3**), enquanto proteínas de regulação negativa de apoptose, por exemplo, a mucina-1, foram reprimidas (**Tabela 4**). Já após 48 h, proteínas inibidoras de apoptose, incluindo a mucina-1, foram induzidas (**Tabela 3**), enquanto uma outra proteína indutora de condensação de cromatina apoptótica foi reprimida (**Tabela 4**). Esses resultados sugeriram que o processo de apoptose fosse ativado em uma fase inicial da infecção de células BME26 por *R. rickettsii* e subvertido pela bactéria ao longo da infecção. A apoptose é um processo de morte celular programada altamente regulado (Elmore, 2007), o qual pode ser ativado em resposta a infecções microbianas (Weinrauch e Zychlinsky, 1999; Ashida et al., 2011), resultando na eliminação das células infectadas e beneficiando as remanescentes. A apoptose pode ser considerada como uma resposta inata induzida para neutralizar infecção



por patógenos (Everett e McFadden, 1999). Os artrópodes, incluindo os carrapatos, possuem um sistema imune muito mais simples que o de vertebrados (Kopáček et al., 2010; Baxter, Contet e Krueger, 2017). Dessa forma, a apoptose pode desempenhar um papel central no controle de infecções nesses animais.

Assim, avaliamos os efeitos o silenciamento gênico de três CDSs de proteínas relacionadas com apoptose sobre a proliferação de *R. rickettsii* em células BME26 (**Tabela 5**). Para tal, silenciemos conjuntamente a expressão de duas proteínas de regulação negativa da apoptose (grupo 1: mucina-1 e grupo D2 de complementação da anemia de Fanconi) ou o indutor de condensação de cromatina apoptótica no núcleo (grupo 2). Um ligeiro e inesperado aumento do número de bactérias foi observado no silenciamento conjunto das proteínas que regulam negativamente a apoptose (**Figura 11**). A mucina-1 (BME26USP-3827 - proteína com função de regulação negativa da via de sinalização apoptótica intrínseca em resposta a danos no DNA pelo mediador da classe p53) é membro da família das mucinas, que são proteínas O-glicosiladas que desempenham um papel essencial na formação de barreiras mucosas de proteção nas superfícies epiteliais (Hang e Bertozzi, 2005). Estas proteínas desempenham ainda um papel importante na sinalização intracelular e na regulação da resposta à infecção por vírus ou bactérias (Linden et al., 2008; Hang e Bertozzi, 2005; McAuley et al., 2017; Navabi et al., 2013). Um estudo demonstrou que o domínio citoplasmático de mucina-1 pode ser clivado e, assim, segue para o núcleo juntamente com o fator de transcrição p53, modulando o ciclo celular e protegendo a célula contra a resposta apoptótica ao estresse (Ren et al., 2006; Wei, Xu e Kufe, 2005). Essa resposta mediada por p53 atenua a liberação de fatores mitocondriais na resposta ao estresse e, conseqüentemente, a via intrínseca de apoptose é modulada (Ren et al., 2004; Wei, Xu e Kufe, 2005). Em humanos, a via da anemia de Fanconi atua no reparo de danos ao DNA, mais especificamente, no reparo de *cross links* inter-fitas de DNA, os quais, por sua vez, impedem a transcrição e replicação. A inativação de qualquer um dos genes dessa via causa a anemia de Fanconi, a qual predispõe o indivíduo à falência da medula óssea e desenvolvimento de câncer (Ceccaldi, Sarangi e D'Andrea, 2016). Em resposta ao dano ao DNA, um heterodímero que inclui as

proteínas grupo D2 de complementação da anemia de Fanconi (FANCD2) e FANCI é monoubiquitinado, orquestrando a ativação da via de Fanconi (Tian et al., 2017). Também foi previamente descrito que o silenciamento gênico da FANCD2 mediado por RNAi leva à ativação da apoptose em células de osteosarcoma MG-63 (Xia et al., 2015). Park e colaboradores (2011) sugerem que o FANCD2 seja um alvo para a via apoptótica mediada por caspase, e que esta proteína pode ser um indicador precoce de morte celular por apoptose. Os estudos demonstraram que é essencial que FANCD2 seja monoubiquitinado para exercer suas funções, bem como a de reparo de DNA (Ceccaldi, Sarangi e D'Andrea, 2016; Rego et al., 2012). No entanto, apenas os níveis de transcritos da mucina-1 foram reduzidos significativamente nesse grupo, com níveis 62% menores em relação ao controle. Assim, estudos adicionais devem ser realizados para determinar o papel de mucina-1 no controle da via intrínseca de apoptose em células BME26, bem como na proliferação de *R. rickettsii*.

Para avaliar se o processo de apoptose, de fato, ocorria em células BME26 e se a infecção por *R. rickettsii* exercia algum efeito sobre esse processo, a integridade do DNAg de células infectadas ou não foi monitorada por eletroforese em gel de agarose. Observamos que a fragmentação de DNAg, característica típica de células em apoptose (Nagata, 2000), ocorre a partir de 96 h apenas nas amostras de células BME26 não infectadas (**Figura 12**). Porém, a infecção por *R. rickettsii* parece ser capaz de impedir a fragmentação do DNAg, o que sugeriu que exerça um efeito inibitório sobre a apoptose.

Em seguida, iniciamos ensaios funcionais para confirmar se *R. rickettsii* inibia a apoptose em células BME26. Assim, avaliamos se a estaurosporina, um clássico e potente indutor de apoptose (Bertrand et al., 1994), ocasionava algum efeito sobre a viabilidade das células. Os resultados das análises demonstraram que a viabilidade de células BME26 é afetada por estaurosporina de maneira dose-dependente, sendo a menor viabilidade celular obtida com a maior concentração de estaurosporina (**Figuras 13**). Além disso, demonstramos que a atividade da caspase-3, uma caspase efetora da apoptose (Nicholson, 1999), também é influenciada pela estaurosporina de modo dose-dependente, sendo a maior

atividade obtida pela maior concentração de estaurosporina (**Figura 14**). Porém, a atividade da caspase-3 em células previamente infectadas por *R. rickettsii* por 48 h foi significativamente menor que em células não infectadas para a concentração de 400 nM de estaurosporina (**Figura 14**). Observamos uma menor atividade da caspase-3 em células infectadas em relação ao controle (células não infectadas) para todas as concentrações de estaurosporina, embora apenas a concentração de 400 nM de estaurosporina tenha resultado em uma diferença significativa.

Para avaliar o tempo de infecção requerido para que a atividade de caspase-3 fosse inibida por *R. rickettsii*, as células BME26 foram pré-infectadas por 24, 36, 48, 60 e 72 h e, então, a apoptose foi induzida por estaurosporina. Observamos que após 36 h de infecção, a atividade de caspase-3 é significativamente menor em células infectadas do que nas células não infectadas, efeito que permanece até 48 h de infecção (**Figura 15**). Esse resultado está de acordo com os resultados obtidos pelo proteoma diferencial, que mostram que proteínas com papel de regulação negativa da apoptose estão induzidas em 48 h de infecção por *R. rickettsii* (**Tabela 3**) enquanto um indutor de condensação de cromatina apoptótica está reprimido (**Tabela 4**).

Para avaliar se componentes produzidos por *R. rickettsii* eram importantes na inibição da atividade da caspase-3, células BME26 foram desafiadas com riquetsias termo-inativadas. Observamos que a inibição enzimática ocorre apenas quando as células estão colonizadas por bactérias viáveis (**Figura 17**). Além disso, analisamos a exposição de fosfatidilserina por microscopia de fluorescência após a marcação das células com anexina V (**Figura 18**). Essa análise mostrou que uma porcentagem maior de células controle e estimuladas com bactérias termo-inativadas é marcada por anexina V em relação às células infectadas com bactérias viáveis. Esse resultado sugeriu que componentes produzidos por *R. rickettsii* sejam responsáveis pela inibição da apoptose. Para completar seu ciclo de desenvolvimento nas células hospedeiras, bactérias intracelulares usam diferentes mecanismos moleculares, incluindo a remodelação do citoesqueleto, a manipulação da resposta imune e o atraso na apoptose celular (Ashida et al., 2011; de la Fuente et al., 2016). Por exemplo, o efetor Ats-1 do sistema de secreção do tipo IV (T4SS)

de *Anaplasma phagocytophilum* age na mitocôndria da célula hospedeira, atrasando a apoptose (Niu et al., 2010), o que é fundamental para que a bactéria finalize seu ciclo de vida em neutrófilos (Yoshiie et al., 2000). Já foi descrito que *R. rickettsii* inibe a apoptose em células endoteliais humanas e que a inibição do sistema proteossomo pelo tratamento com MG 132 causa uma rápida morte celular, pois impede que o inibidor do NF- $\kappa$ B, seja degradado (Clifton et al., 1998). Dessa forma, o deslocamento do NF- $\kappa$ B para o núcleo é impedido, não ocorrendo a inibição da apoptose. A ativação do NF- $\kappa$ B também é essencial para a manter a integridade mitocondrial, assegurando o equilíbrio entre proteínas pró- e anti- apoptóticas, e previnem a ativação da caspase (Bechelli et al., 2009; Rydkina, Turpin e Sahni, 2010; Clifton et al., 1998; Joshi et al., 2003; Joshi et al., 2004). A manipulação da apoptose de células de carrapatos, tanto *in vivo* (órgãos de carrapatos) como *in vitro* (cultivos celulares) por *A. phagocytophilum* uma bactéria intracelular como *R. rickettsii*, também foi previamente reportada (Alberdi et al., 2016; Ayllón et al., 2013; Villar, Ayllón, Kocan, et al., 2015; Cabezas-Cruz et al., 2016). Porém divergências em relação às vias de ativação da apoptose foram observadas. No intestino de carrapatos, o patógeno inibe a apoptose através da via de Janus quinase/transdutores de sinal e ativadores da transcrição (JAK/STAT), enquanto nas glândulas salivares *A. phagocytophilum*, inibe a via intrínseca, mas ativa a via extrínseca de apoptose (Ayllón et al., 2015). Em células do carrapato *I. scapularis* (ISE6) e em células de *I. ricinus* (IRE/CTVM20), a infecção bacteriana regula negativamente a via intrínseca através da regulação de uma proteína mitocondrial, a porina, que manipula o processamento de proteínas no retículo endoplasmático para inibir a apoptose e facilitar a infecção (Alberdi et al., 2015). Assim, uma melhor caracterização da apoptose em carrapatos é necessária para melhor compreensão do processo de regulação das vias de apoptose.

Por fim, avaliamos os efeitos tanto da indução quanto da inibição química da apoptose sobre a proliferação de *R. rickettsii* em células BME26. Para isso, utilizamos a estaurosporina e um inibidor de caspase-3, Z-DEVD-Fmk, o qual apresenta um efeito irreversível e não citotóxico em linhagens celulares humanas (Suzuki et al., 2001). Primeiramente, avaliamos a citotoxicidade do Z-DEVD-Fmk

sobre as células BME26. Os resultados mostraram que o inibidor não é tóxico até a máxima concentração avaliada (25  $\mu\text{M}$ ). (**Figura 19**). Além disso, foi observado um efeito inibitório pronunciado sobre a atividade de caspase-3 nas concentrações de 25 e 10  $\mu\text{M}$  (**Figura 20**). Assim, 1 h antes da infecção por *R. rickettsii*, as células BME26 foram tratadas com estaurosporina (400 nM) ou com Z-DEVD-Fmk (10  $\mu\text{M}$ ) e o crescimento bacteriano foi avaliado por qPCR por 120 h (**Figura 21**). O crescimento de *R. rickettsii* foi maior em células BME26 tratadas com o inibidor de caspase-3 do que em células não tratadas, indicando que a inibição da apoptose favoreça a infecção. Por outro lado, a indução de apoptose com estaurosporina ocasionou uma redução do número de bactérias. Em conjunto, os dados demonstram que *R. rickettsii* é capaz de regular a apoptose em células de carrapatos e que essa regulação é importante para garantir a colonização da célula hospedeira pela bactéria. Além disso, é possível que *R. rickettsii* não consiga invadir de maneira eficiente células já em apoptose, o que reforça ainda mais a importância de se regular esse processo de morte celular, de modo a garantir a invasão celular por riquetsias. Essa é a primeira vez que a regulação da apoptose em células de carrapatos é descrita para bactérias do gênero *Rickettsia*. Será importante demonstrar que os dados obtidos pelo presente trabalho, que empregou um modelo *in vitro* para os estudos das interações entre carrapatos e *R. rickettsii*, também ocorrem no modelo *in vivo*, ou seja, nos órgãos de carrapatos vetores.

## 6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos pelo desenvolvimento do presente projeto demonstraram que a linhagem BME26 é susceptível à infecção por *R. rickettsii*. O estabelecimento de uma linhagem celular como modelo para o estudo da interação carrapato-*R. rickettsii* é importante, pois, conforme mencionado anteriormente, a obtenção de carrapatos envolve o uso de animais vertebrados. Além disso, são necessários cerca de seis a oito meses para a obtenção do ciclo de vida completo de carrapatos *Amblyomma* spp. em laboratório.

O conjunto de dados obtidos pelo proteoma demonstraram que a bactéria *R. rickettsii* foi capaz de modular a expressão de diversas proteínas da célula hospedeira de modo tempo-dependente, dentre as quais destacam-se proteínas envolvidas no processo de apoptose, proteínas do complexo ubiquitina-proteassomo e proteínas de citoesqueleto. Estudos funcionais demonstraram que *R. rickettsii* é capaz de inibir a apoptose na linhagem celular BME26 e que essa inibição depende da presença de bactérias viáveis. Além disso, o crescimento bacteriano é maior quando a apoptose é inibida quimicamente e menor quando o processo é induzido, demonstrando que *R. rickettsii* seja favorecida pela inibição da apoptose.

Estudos futuros deverão ser realizados para a identificação dos fatores das células de carrapatos e de *R. rickettsii* envolvidos na ativação e na inibição do processo apoptótico, podendo auxiliar numa melhor compreensão da interação vetor-patógeno.

## Referências bibliográficas

- Ahmed, Ashraf M., e Hilary Hurd. 2006. "Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis". *Microbes and Infection* 8 (2): 308–15. doi:10.1016/j.micinf.2005.06.026.
- Alberdi, Pilar, Nieves Ayllón, Alejandro Cabezas-Cruz, Lesley Bell-Sakyi, Erich Zweggarth, Snorre Stuen, e José de la Fuente. 2015. "Infection of *Ixodes* spp. tick cells with different *Anaplasma phagocytophilum* isolates induces the inhibition of apoptotic cell death". *Ticks and Tick-borne Diseases*. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.07.001.
- Alberdi, Pilar, Pedro Espinosa, Alejandro Cabezas-Cruz, e José de la Fuente. 2016. "Anaplasma phagocytophilum Manipulates Host Cell Apoptosis by Different Mechanisms to Establish Infection". *Veterinary Sciences*. doi:10.3390/vetsci3030015.
- Aljamali, Majd N, John R Sauer, e Richard C Essenberg. 2002. "RNA interference: applicability in tick research." *Experimental & applied acarology* 28 (1–4): 89–96. doi:10.1023/A:1025346131903.
- Alvarez-Martinez, C. E., e P. J. Christie. 2009. "Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73 (4): 775–808. doi:10.1128/MMBR.00023-09.
- Angerami, R N, M R Resende, A F C Feltrin, G Katz, E M Nascimento, R S B Stucchi, e L J Silva. 2006. "Brazilian spotted fever: A case series from an endemic area in southeastern Brazil. Clinical aspects". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078: 252–54. doi:10.1196/annals.1374.044.
- Ashida, Hiroshi, Hitomi Mimuro, Michinaga Ogawa, Taira Kobayashi, Takahito Sanada, Minsoo Kim, e Chihiro Sasakawa. 2011. "Cell death and infection: A double-edged sword for host and pathogen survival". *Journal of Cell Biology*. doi:10.1083/jcb.201108081.

- Ashkenazi, Avi. 2008. "Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists". *Nature Reviews Drug Discovery* 7 (12): 1001–12. doi:10.1038/nrd2637.
- Ayllón, Nieves, Margarita Villar, Ann T. Busby, Katherine M. Kocan, Edmour F. Blouin, Elena Bonzón-Kulichenko, Ruth C. Galindo, et al. 2013. "Anaplasma phagocytophilum Inhibits Apoptosis and Promotes Cytoskeleton Rearrangement for Infection of Tick Cells". *Infection and Immunity*. doi:10.1128/IAI.00194-13.
- Ayllón, Nieves, Margarita Villar, Ruth C. Galindo, Katherine M. Kocan, Radek Šíma, Juan A. López, Jesús Vázquez, et al. 2015. "Systems Biology of Tissue-Specific Response to Anaplasma phagocytophilum Reveals Differentiated Apoptosis in the Tick Vector Ixodes scapularis". *PLoS Genetics* 11 (3): 1–29. doi:10.1371/journal.pgen.1005120.
- Azad, a F, e C B Beard. 1998. "Rickettsial pathogens and their arthropod vectors." *Emerging infectious diseases* 4 (2): 179–86. doi:10.3201/eid0402.980205.
- Bader, Maya, e Hermann Steller. 2009. "Regulation of cell death by the ubiquitin-proteasome system". *Current Opinion in Cell Biology*. doi:10.1016/j.ceb.2009.09.005.
- Bartholomay, Lyric C., Wen Long Cho, Thomas A. Rocheleau, Jon P. Boyle, Eric T. Beck, Jeremy F. Fuchs, Paul Liss, et al. 2004. "Description of the transcriptomes of immune response-activated hemocytes from the mosquito vectors Aedes aegypti and Armigeres subalbatus". *Infection and Immunity* 72 (7): 4114–26. doi:10.1128/IAI.72.7.4114-4126.2004.
- Baxter, Richard H.G., Alicia Contet, e Kathryn Krueger. 2017. "Arthropod Innate Immune Systems and Vector-Borne Diseases". *Biochemistry* 56 (7): 907–18. doi:10.1021/acs.biochem.6b00870.
- Bechelli, Jeremy R., Elena Rydkina, Punsiri M. Colonne, e Sanjeev K. Sahni. 2009. "Rickettsia rickettsii Infection Protects Human Microvascular Endothelial Cells against Staurosporine-Induced Apoptosis by a cIAP<sub>2</sub>-Independent



- Mechanism". *The Journal of Infectious Diseases*. doi:10.1086/597805.
- Bell-Sakyi, Lesley, Erich Zweygarth, Edmour F. Blouin, Ernest a. Gould, e Frans Jongejan. 2007. "Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research". *Trends in Parasitology* 23 (9): 450–57. doi:10.1016/j.pt.2007.07.009.
- Bergsbaken, T., e B. T. Cookson. 2009. "Innate immune response during Yersinia infection: critical modulation of cell death mechanisms through phagocyte activation". *Journal of Leukocyte Biology*. doi:10.1189/jlb.0309146.
- Bertrand, Richard, Eric Solary, Patrick O'Connor, Kurt W. Kohn, e Yves Pommier. 1994. "Induction of a Common Pathway of Apoptosis by Staurosporine". *Experimental Cell Research* 211 (2). Academic Press: 314–21. doi:10.1006/EXCR.1994.1093.
- Bifano, Thais D., Massaro W. Ueti, Eliane Esteves, Kathryn E. Reif, Glória R C Braz, Glen A. Scoles, Reginaldo G. Bastos, Stephen N. White, e Sirlei Daffre. 2014. "Knockdown of the Rhipicephalus microplus cytochrome c oxidase subunit III gene is associated with a failure of Anaplasma marginale transmission". *PLoS ONE* 9 (5): 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0098614.
- Blanc, Guillaume, Hiroyuki Ogata, Catherine Robert, Stéphane Audic, Karsten Suhre, Guy Vestris, Jean-Michel Claverie, e Didier Raoult. 2007. "Reductive Genome Evolution from the Mother of Rickettsia". *PLoS Genetics* 3 (1): e14. doi:10.1371/journal.pgen.0030014.
- Boyce, John D., Paul a. Cullen, e Ben Adler. 2004. "Genomic-scale analysis of bacterial gene and protein expression in the host". *Emerging Infectious Diseases* 10 (8): 1357–62. doi:10.3201/eid1008.031036.
- Bryant, Bart, Carol D. Blair, Ken E. Olson, e Rollie J. Clem. 2008. "Annotation and expression profiling of apoptosis-related genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. doi:10.1016/j.ibmb.2007.11.012.
- Burgdorfer, W., e Lyle P Brinton. 1975. "Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks." *Annals of the New York Academy of*

- Sciences* 266 (1): 61–72. doi:10.1111/j.1749-6632.1975.tb35088.x.
- Cabezas-Cruz, Alejandro, Pilar Alberdi, Nieves Ayllón, James J. Valdés, Raymond Pierce, Margarita Villar, e José de la Fuente. 2016. “Anaplasma phagocytophilum increases the levels of histone modifying enzymes to inhibit cell apoptosis and facilitate pathogen infection in the tick vector *Ixodes scapularis*”. *Epigenetics* 11 (4): 303–19. doi:10.1080/15592294.2016.1163460.
- Cameron, Lisa A., Paula A. Giardini, Frederick S. Soo, e Julie A. Theriot. 2000. “Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1 (2): 110–19. doi:10.1038/35040061.
- Carlyon, Jason A., e Erol Fikrig. 2003. “Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*”. *Cellular Microbiology* 5 (11): 743–54. doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00323.x.
- Ceccaldi, Raphael, Prabha Sarangi, e Alan D. D’Andrea. 2016. “The Fanconi anaemia pathway: New players and new functions”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (6): 337–49. doi:10.1038/nrm.2016.48.
- Chan, Yvonne G Y, Marissa M. Cardwell, Timothy M. Hermanas, Tsuneo Uchiyama, e Juan J. Martinez. 2009. “Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner.” *Cellular microbiology* 11 (4): 629–44. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01279.x.
- Chapman, Alice S, Staci M Murphy, Linda J Demma, Robert C Holman, Aaron T Curns, Jennifer H McQuiston, John W Krebs, e David L Swerdlow. 2006. “Rocky Mountain spotted fever in the United States, 1997-2002.” *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 6 (2): 170–78. <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ast.2007.0153>.
- Chen, Luke F., e Daniel J. Sexton. 2008. “What’s New in Rocky Mountain Spotted Fever?” *Infectious Disease Clinics of North America* 22 (3): 415–32. doi:10.1016/j.idc.2008.03.008.

- Clifton, D R, R a Goss, S K Sahni, D van Antwerp, R B Baggs, V J Marder, D J Silverman, e L a Sporn. 1998. "NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (April): 4646–51. doi:10.1073/pnas.95.8.4646.
- Cooper, Dawn M., David J. Granville, e Carl Lowenberger. 2009. "The insect caspases". *Apoptosis*. doi:10.1007/s10495-009-0322-1.
- Cooper, Dm, e K Mitchell-Foster. 2011. "Death for survival: what do we know about innate immunity and cell death in insects?" *ISJ* 8: 162–72.
- Cox, Jürgen, e Matthias Mann. 2008. "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification." *Nature biotechnology* 26 (12): 1367–72. doi:10.1038/nbt.1511.
- Cox, Jürgen, Nadin Neuhauser, Annette Michalski, Richard A. Scheltema, Jesper V. Olsen, e Matthias Mann. 2011. "Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment". *Journal of Proteome Research* 10 (4): 1794–1805. doi:10.1021/pr101065j.
- Dantas-Torres, Filipe. 2007. "Rocky Mountain spotted fever". *The Lancet Infectious Diseases* 7 (11): 724–32. doi:10.1016/S1473-3099(07)70261-X.
- Dantas-Torres, Filipe, Bruno B. Chomel, e Domenico Otranto. 2012. "Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective". *Trends in Parasitology* 28 (10). Elsevier Ltd: 437–46. doi:10.1016/j.pt.2012.07.003.
- de la Fuente, Jose de. 2008. "Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals". *Frontiers in Bioscience* Volume (13): 6938. doi:10.2741/3200.
- de la Fuente, José De, Consuelo Almazán, Edmour F. Blouin, Victoria Naranjo, e Katherine M. Kocan. 2005. "RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens". *Parasitology Research* 96 (3): 137–41. doi:10.1007/s00436-005-1351-5.

- de la Fuente, José de, Sandra Antunes, Sarah Bonnet, Alejandro Cabezas-Cruz, Ana G. Domingos, Agustín Estrada-Peña, Nicholas Johnson, et al. 2017. "Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (April): 1–13. doi:10.3389/fcimb.2017.00114.
- de la Fuente, José de, Edmour F. Blouin, Raúl Manzano-Roman, Victoria Naranjo, Consuelo Almazán, José Manuel Pérez de la Lastra, Zorica Zivkovic, Frans Jongejan, e Katherine M. Kocan. 2007. "Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*". *Genomics* 90 (6): 712–22. doi:10.1016/j.ygeno.2007.08.009.
- de la Fuente, José de, Agustín Estrada-Peña, Alejandro Cabezas-Cruz, e Katherine M. Kocan. 2016. "Anaplasma phagocytophilum Uses Common Strategies for Infection of Ticks and Vertebrate Hosts". *Trends in Microbiology* 24 (3). Elsevier Ltd: 173–80. doi:10.1016/j.tim.2015.12.001.
- de la Fuente, José de, Katherine M. Kocan, Consuelo Almazán, e Edmour F. Blouin. 2007. "RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks." *Trends in parasitology* 23 (9): 427–33. doi:10.1016/j.pt.2007.07.002.
- Derakhshan, Adeeb, Zhong Chen, e Carter Van Waes. 2017. "Therapeutic small molecules target inhibitor of apoptosis proteins in cancers with deregulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways". *Clinical Cancer Research*. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2172.
- Desouza, Melissa, Peter W. Gunning, e Justine R. Stehn. 2012. "The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis". *BioArchitecture*. doi:10.4161/bioa.20975.
- Diop, Awa, Didier Raoult, e Pierre-Edouard Fournier. 2017. "Rickettsial genomics and the paradigm of genome reduction associated with increased virulence". *Microbes and Infection*, n° January. Elsevier Masson SAS: 1–9. doi:10.1016/j.micinf.2017.11.009.

- Dramsi, S, e P Cossart. 1998. "Intracellular Pathogens and the Actin Cytoskeleton". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 137–66. doi:10.1146/annurev.cellbio.14.1.137.
- Ekert, P G, e D L Vaux. 1997. "Apoptosis and the immune system." *British medical bulletin* 53 (3): 591–603. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3793624>.
- Ekert, Paul G., e David L. Vaux. 1997. "Apoptosis and the immune system". *British Medical Bulletin*. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a011632.
- Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death". *Toxicologic Pathology*. doi:10.1080/01926230701320337.
- Eng, Matthew W, Madeleine N van Zuylen, e David W Severson. 2016. "Apoptosis-related genes control autophagy and influence DENV-2 infection in the mosquito vector, *Aedes aegypti*." *Insect biochemistry and molecular biology* 76: 70–83. doi:10.1016/j.ibmb.2016.07.004.
- Esteves, E., C. V. Bastos, Z. Zivkovic, J. de La Fuente, K. Kocan, E. Blouin, M. F B Ribeiro, L. M F Passos, e S. Daffre. 2009. "Propagation of a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage in a tick cell line (BME26) derived from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*". *Veterinary Parasitology* 161 (1–2): 150–53. doi:10.1016/j.vetpar.2008.12.006.
- Esteves, Eliane, Flavio A. Lara, Daniel M. Lorenzini, Gustavo H.N. Costa, Aline H. Fukuzawa, Luis N. Pressinotti, José Roberto M.C. Silva, et al. 2008. "Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*". *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38 (5): 568–80. doi:10.1016/j.ibmb.2008.01.006.
- Estripeaut, Dora, María Gabriela Aramburú, Xavier Sáez-Llorens, Herbert A. Thompson, Gregory A. Dasch, Christopher D. Paddock, Sherif Zaki, e Marina E. Ereemeeva. 2007. "Rocky Mountain spotted fever, Panama". *Emerging Infectious Diseases* 13 (11): 1763–65. doi:10.3201/eid1311.070931.
- Everett, Helen, e Grant McFadden. 1999. "Apoptosis: An innate immune response to virus infection". *Trends in Microbiology*. doi:10.1016/S0966-842X(99)01487

- Fadok, Valerie A., e Giovanna Chimini. 2001. "The phagocytosis of apoptotic cells". *Seminars in Immunology* 13 (6): 365–72. doi:10.1006/smim.2001.0333.
- Franklin-Tong, Veronica E., e Campbell W. Gourlay. 2008. "A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals". *Biochemical Journal*. doi:10.1042/BJ20080320.
- Fuentes, Luis. 1986. "Ecological study of Rocky Mountain spotted fever in Costa Rica". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35 (1): 192–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3080917>.
- Galindo, I., B. Hernáez, R. Muñoz-Moreno, M. A. Cuesta-Geijo, I. Dalmau-Mena, e C. Alonso. 2012. "The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection". *Cell Death and Disease*. doi:10.1038/cddis.2012.81.
- Galletti, Maria Fernanda B. M. 2013. "Efeitos da temperatura e da alimentação sanguínea sobre o perfil de expressão gênica de *Rickettsia rickettsii* durante a infecção do carrapato-vetor *Amblyomma aureolatum*". Universidade de São Paulo - USP.
- Galletti, Maria Fernanda B. M., André Fujita, Milton Y. Nishiyama Jr, Camila D. Malossi, Adriano Pinter, João F. Soares, Sirlei Daffre, Marcelo B. Labruna, e Andréa C. Fogaça. 2013. "Natural Blood Feeding and Temperature Shift Modulate the Global Transcriptional Profile of *Rickettsia rickettsii* Infecting Its Tick Vector". Organizado por Ulrike Gertrud Munderloh. *PLoS ONE* 8 (10): e77388. doi:10.1371/journal.pone.0077388.
- Galletti, Maria Fernanda B M, André Fujita, Rafael D Rosa, Larissa A Martins, Herbert S Soares, Marcelo B Labruna, Sirlei Daffre, e Andréa C Fogaça. 2016. "Virulence genes of *Rickettsia rickettsii* are differentially modulated by either temperature upshift or blood-feeding in tick midgut and salivary glands." *Parasites & vectors* 9 (1). Parasites & Vectors: 331. doi:10.1186/s13071-016-1581-7.

- Galvão, Márcio A. M., Joel A. Lamounier, Elido Bonomo, Margarete S. Tropaia, Eliane G. Rezende, Simone B. Calic, Chequer B. Chamone, et al. 2002. "Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil". *Cadernos de Saúde Pública* 18 (6): 1593–97. doi:10.1590/S0102-311X2002000600013.
- Garduno, R. A., E. Garduno, Margot Hiltz, e Paul S Hoffman. 2002. "Intracellular Growth of *Legionella pneumophila* Gives Rise to a Differentiated Form Dissimilar to Stationary-Phase Forms". *Infection and Immunity* 70 (11): 6273–83. doi:10.1128/IAI.70.11.6273-6283.2002.
- Ge, Yan, e Yasuko Rikihisa. 2006. "Anaplasma phagocytophilum delays spontaneous human neutrophil apoptosis by modulation of multiple apoptotic pathways". *Cellular Microbiology*. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00720.x.
- Gilford, H.J., e Winston H Price. 1955. "Virulent-avirulent conversions of *Rickettsia rickettsii* in vitro". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 41: 870–78.
- Girard, Y A, V Popov, J Wen, V Han, e S Higgs. 2005. "Ultrastructural study of West Nile virus pathogenesis in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)." *Journal of Medical Entomology* 42 (3): 429–44.
- Girard, Yvette a, Bradley S Schneider, Charles E Mcgee, Julie Wen, Violet C Han, Vsevolod Popov, Peter W Mason, e Stephen Higgs. 2007. "Long-term cytopathologic West Nile virus infection in *Culex* mosquitoes". *Tropical Medicine* 76 (1): 118–28.
- Gouin, Edith, Coumaran Egile, Pierre Dehoux, Véronique Villiers, Josephine Adams, Frank Gertler, Rong Li, e Pascale Cossart. 2004. "The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex." *Nature* 427 (6973): 457–61. doi:10.1038/nature02318.
- Gouin, Edith, Matthew D. Welch, e Pascale Cossart. 2005. "Actin-based motility of intracellular pathogens". *Current Opinion in Microbiology* 8 (1): 35–45. doi:10.1016/j.mib.2004.12.013.

- Gourlay, Campbell W., e Kathryn R. Ayscough. 2005. "The actin cytoskeleton: A key regulator of apoptosis and ageing?" *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (7): 583–89. doi:10.1038/nrm1682.
- Grabowski, Jeffrey M., Rushika Perera, Ali M. Roumani, Victoria E. Hedrick, Halina D. Inerowicz, Catherine A. Hill, e Richard J. Kuhn. 2016. "Changes in the Proteome of Langat-Infected Ixodes scapularis ISE6 Cells: Metabolic Pathways Associated with Flavivirus Infection". *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (2): 1–25. doi:10.1371/journal.pntd.0004180.
- Graça-Souza, Aurélio V., Clarissa Maya-Monteiro, Gabriela O. Paiva-Silva, Glória R.C. Braz, Márcia C. Paes, Marcos H.F. Sorgine, Marcus F. Oliveira, e Pedro L. Oliveira. 2006. "Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods". *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36 (4 SPEC. ISS.): 322–35. doi:10.1016/j.ibmb.2006.01.009.
- Guedes, Elizângela, Romário C. Leite, Márcia C a Prata, Richard C. Pacheco, David H. Walker, e Marcelo B. Labruna. 2005. "Detection of Rickettsia rickettsii in the tick Amblyomma cajennense in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100 (December): 841–45. doi:10.1590/S0074-02762005000800004.
- Han, Y. S., J. Thompson, F. C. Kafatos, e C. Barillas-Mury. 2000. "MC8 - Molecular interactions between Anopheles stephensi midgut cells and Plasmodium berghei: The time bomb theory of ookinete invasion". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95 (SUPPL. 2): 28–29. doi:10.1093/emboj/19.22.6030.
- Hang, Howard C, e Carolyn R Bertozzi. 2005. "The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation". *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13 (17): 5021–34. doi:10.1016/j.bmc.2005.04.085.
- Hidalgo, Marylin, Leonora Orejuela, Patricia Fuya, Pilar Carrillo, Jorge Hernandez, Edgar Parra, Colette Keng, et al. 2007. "Rocky Mountain Spotted Fever, Colombia". *Emerging Infectious Diseases* 13 (7): 1058–60. doi:10.3201/eid1307.060537.



- Hofmann, Wilma A., e Primal De Lanerolle. 2006. "Nuclear actin: To polymerize or not to polymerize". *Journal of Cell Biology* 172 (4): 495–96. doi:10.1083/jcb.200601095.
- Hopwood, J a, a M Ahmed, a Polwart, G T Williams, e H Hurd. 2001. "Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries: a mechanism to control vector egg production." *The Journal of experimental biology* 204 (Pt 16): 2773–80.
- Horta, Maurício C., Marcelo B. Labruna, Adriano Pinter, Pedro M. Linardi, e Teresinha T.S. Schumaker. 2007. "Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (7): 793–801. doi:10.1590/S0074-02762007000700003.
- Hun, Laya, Ximena Cortés, e Lizeth Taylor. 2008. "Molecular characterization of Rickettsia rickettsii isolated from human clinical samples and from the rabbit tick Haemaphysalis leporispalustris collected at different geographic zones in Costa Rica". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79 (6): 899–902.
- Jeng, Robert L., Erin D. Goley, Joseph A. D'Alessio, Oleg Y. Chaga, Tatyana M. Svitkina, Gary G. Borisy, Robert A. Heinzen, e Matthew D. Welch. 2004. "A Rickettsia WASP-like protein activates the Arp2/3 complex and mediates actin-based motility". *Cellular Microbiology* 6 (8): 761–69. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00402.x.
- Joshi, Suresh G., Charles W. Francis, David J. Silverman, e Sanjeev K. Sahni. 2003. "Nuclear factor ??B protects against host cell apoptosis during Rickettsia rickettsii infection by inhibiting activation of apical and effector caspases and maintaining mitochondrial integrity". *Infection and Immunity*. doi:10.1128/IAI.71.7.4127-4136.2003.
- Joshi, Suresh G, Charles W Francis, David J Silverman, e Sanjeev K Sahni. 2004. "NF-kappaB activation suppresses host cell apoptosis during Rickettsia rickettsii infection via regulatory effects on intracellular localization or levels of apoptogenic and anti-apoptotic proteins." *FEMS microbiology letters* 234 (2): 333–41. doi:10.1016/j.femsle.2004.03.046.

- Kalil, Sandra Patricia, Rafael Diego da Rosa, Janaína Capelli-Peixoto, Paula Cristiane Pohl, Pedro Lagerblad de Oliveira, Andrea Cristina Fogaça, e Sirlei Daffre. 2017. "Immune-related redox metabolism of embryonic cells of the tick *Rhipicephalus microplus* (BME26) in response to infection with *Anaplasma marginale*". *Parasites & Vectors* 10 (1). Parasites & Vectors: 613. doi:10.1186/s13071-017-2575-9.
- Karim, Shahid, Parul Singh, e José M C Ribeiro. 2011. "A Deep Insight into the Sialotranscriptome of the Gulf Coast Tick, *Amblyomma maculatum*." *PloS one* 6 (12): e28525. doi:10.1371/journal.pone.0028525.
- Kelly, Erica M., Daniel C. Moon, e Doria F. Bowers. 2012. "Apoptosis in mosquito salivary glands: Sindbis virus-associated and tissue homeostasis". *Journal of General Virology* 93 (PART 11): 2419–24. doi:10.1099/vir.0.042846-0.
- Kocan, Katherine M, Edmour Blouin, e José De La Fuente. 2011. "RNA interference in ticks". *Journal of visualized experiments : JoVE*, nº 47: 1–5. doi:10.3791/2474.
- Kopáček, Petr, Ondrej Hajdusek, Veronika Buresová, e Sirlei Daffre. 2010. "Tick innate immunity." *Advances in experimental medicine and biology* 708: 137–62. doi:0065-2598.
- Kumar, Sanjeev, Lalita Gupta, Yeon Soo Han, e Carolina Barillas-Mury. 2004. "Inducible Peroxidases Mediate Nitration of Anopheles Midgut Cells Undergoing Apoptosis in Response to Plasmodium Invasion". *Journal of Biological Chemistry* 279 (51): 53475–82. doi:10.1074/jbc.M409905200.
- Kurtti, Timothy J., Joshua T. Mattila, Michael J. Herron, Roderick F. Felsheim, Gerald D. Baldridge, Nicole Y. Burkhardt, Bruce R. Blazar, Perry B. Hackett, Jason M. Meyer, e Ulrike G. Munderloh. 2008. "Transgene expression and silencing in a tick cell line: A model system for functional tick genomics". *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38 (10): 963–68. doi:10.1016/j.ibmb.2008.07.008.

- La, My Van, Didier Raoult, e Patricia Renesto. 2008. "Regulation of whole bacterial pathogen transcription within infected hosts". *FEMS Microbiology Reviews* 32 (3): 440–60. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00103.x.
- Labruna, Marcelo B. 2009. "Ecology of Rickettsia in South America". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1166 (1): 156–66. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x.
- Labruna, Marcelo B., Maria Ogrzewalska, João F. Soares, Thiago F. Martins, Herbert S. Soares, Jonas Moraes-Filho, Fernanda A. Nieri-Bastos, Aliny P. Almeida, e Adriano Pinter. 2011. "Experimental Infection of *Amblyomma aureolatum* Ticks with *Rickettsia rickettsii*". *Emerging Infectious Diseases* 17 (5): 829–34. doi:10.3201/eid1705.101524.
- Labruna, Marcelo B., Ted Whitworth, Maurício C. Horta, Donald H. Bouyer, Jere W. McBride, Adriano Pinter, Vsevolod Popov, Solange M. Gennari, e David H. Walker. 2004. "*Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic". *Journal of clinical microbiology* 42 (1): 90–98. doi:10.1128/JCM.42.1.90-98.2004.
- Labruna, Marcelo B, Maria Ogrzewalska, Thiago F Martins, Adriano Pinter, e Maurício C Horta. 2008. "Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*." *Journal of medical entomology* 45 (6): 1156–59. doi:10.1603/0022-2585(2008)45[1156:CSOLSO]2.0.CO;2.
- Lamkanfi, Mohamed, e Vishva M. Dixit. 2010. "Manipulation of host cell death pathways during microbial infections". *Cell Host and Microbe*. doi:10.1016/j.chom.2010.06.007.
- Larionov, Alexey, Andreas Krause, e William Miller. 2005. "A standard curve based method for relative real time PCR data processing". *BMC bioinformatics* 6: 62. doi:10.1186/1471-2105-6-62.

- Lecker, S. H. 2006. "Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States". *Journal of the American Society of Nephrology* 17 (7): 1807–19. doi:10.1681/ASN.2006010083.
- Lee, Hin C., e Jesse L. Goodman. 2006. "Anaplasma phagocytophilum causes global induction of antiapoptosis in human neutrophils". *Genomics*. doi:10.1016/j.ygeno.2006.06.002.
- Lee, Hin C, Mitomu Kioi, Jing Han, Raj K Puri, e Jesse L Goodman. 2008. "Anaplasma phagocytophilum-induced gene expression in both human neutrophils and HL-60 cells". *Genomics* 92 (3): 144–51. doi:10.1016/j.ygeno.2008.05.005.
- Lemos, Elba Regina Sampaio de, Tatiana Rozental, e Cid Leite Villela. 2002. "Brazilian spotted fever: description of a fatal clinical case in the State of Rio de Janeiro." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35 (5): 523–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12621675>.
- Linden, S K, P Sutton, N G Karlsson, V Korolik, e M A McGuckin. 2008. "Mucins in the mucosal barrier to infection". *Mucosal Immunology* 1 (3): 183–97. doi:10.1038/mi.2008.5.
- Livak, K J, e T D Schmittgen. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25 (4): 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Lowe, S W, e a W Lin. 2000. "Apoptosis in cancer". *Carcinogenesis* 21 (3): 485–95. doi:10.1093/carcin/21.3.485.
- Martins, Larissa A, Maria F B de Melo Galletti, José M Ribeiro, André Fujita, Francisco B. Costa, Marcelo B Labruna, Sirlei Daffre, e Andréa C. Fogaça. 2017. "The Distinct Transcriptional Response of the Midgut of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* Ticks to *Rickettsia rickettsii* Correlates to Their Differences in Susceptibility to Infection." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7: 129. doi:10.3389/fcimb.2017.00129.

- McAuley, J L, L Corcilius, H-x Tan, R J Payne, M A McGuckin, e L E Brown. 2017. "The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection". *Mucosal Immunology* 10 (6). Nature Publishing Group: 1581–93. doi:10.1038/mi.2017.16.
- McStay, Gavin P., e Douglas R. Green. 2014. "Measuring apoptosis: Caspase inhibitors and activity assays". *Cold Spring Harbor Protocols*. doi:10.1101/pdb.top070359.
- Mosmann, Tim. 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of immunological methods* 65 (1–2): 55–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>.
- Munderloh, U G, S D Jauron, V Fingerle, L Leitritz, S F Hayes, J M Hautman, C M Nelson, et al. 1999. "Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture." *Journal of clinical microbiology* 37 (8): 2518–24.
- Munderloh, U G, e T J Kurtti. 1989. "Formulation of medium for tick cell culture." *Experimental & applied acarology* 7 (3): 219–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2766897>.
- Munderloh, U G, Y J Park, J M Diod, A M Fallon, e T J Kurtti. 1993. "Plasmid modifications in a tick-borne pathogen, *Borrelia burgdorferi*, cocultured with tick cells." *Insect molecular biology* 1 (4): 195–203. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8269098>.
- Nagata, Shigekazu. 2000. "Apoptotic DNA fragmentation". *Experimental Cell Research*. doi:10.1006/excr.2000.4834.
- Nakayasu, Ernesto S., Tiago J P Sobreira, Rafael Torres, Luciane Ganiko, Paulo S L Oliveira, Alexandre F. Marques, e Igor C. Almeida. 2012. "Improved proteomic approach for the discovery of potential vaccine targets in *Trypanosoma cruzi*". *Journal of Proteome Research* 11: 237–46. doi:10.1021/pr200806s.

- Nava, Santiago, Lorenza Beati, Marcelo B. Labruna, Abraham G. Cáceres, Atilio J. Mangold, e Alberto A. Guglielmone. 2014. "Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1". *Ticks and Tick-borne Diseases* 5 (3). Elsevier GmbH.: 252–76. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.11.004.
- Navabi, Nazanin, Malin E V Johansson, Sukanya Raghavan, e Sara K. Lindén. 2013. "Helicobacter pylori Infection Impairs the Mucin Production Rate and Turnover in the Murine Gastric Mucosa". Organizado por B. A. McCormick. *Infection and Immunity* 81 (3): 829–37. doi:10.1128/IAI.01000-12.
- Nicholson, D. W. 1999. "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death". *Cell Death and Differentiation*. doi:10.1038/sj.cdd.4400598.
- Nicholson, William L., Kelly E. Allen, Jennifer H. McQuiston, Edward B. Breitschwerdt, e Susan E. Little. 2010. "The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people". *Trends in Parasitology* 26 (4). Elsevier Ltd: 205–12. doi:10.1016/j.pt.2010.01.007.
- Niebylski, Mark L, Mort G Peacock, e T G Schwan. 1999. "Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*).". *Applied and environmental microbiology* 65 (2): 773–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9925615>.
- Niu, Hua, Vera Kozjak-Pavlovic, Thomas Rudel, e Yasuko Rikihisa. 2010. "Anaplasma phagocytophilum Ats-1 is imported into host cell mitochondria and interferes with apoptosis induction." *PLoS pathogens* 6 (2): e1000774. doi:10.1371/journal.ppat.1000774.
- Ocampo, Clara B., Paola A. Caicedo, Gloria Jaramillo, Raul Ursic Bedoya, Olga Baron, Idalba M. Serrato, Dawn M. Cooper, e Carl Lowenberger. 2013. "Differential Expression of Apoptosis Related Genes in Selected Strains of *Aedes aegypti* with Different Susceptibilities to Dengue Virus". *PLoS ONE*.

doi:10.1371/journal.pone.0061187.

Ogata, H., S. Audic, P. Renesto-Audiffren, P. E. Fournier, V. Barbe, D. Samson, V. Roux, et al. 2001. "Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*". *Science* 293 (5537): 2093–98.

Paddock, Christopher D, Susana Fernandez, Gustavo a Echenique, John W Sumner, Will K Reeves, Sherif R Zaki, e Carlos E Remondegui. 2008. "Rocky Mountain spotted fever in Argentina." *The American journal of tropical medicine and hygiene* 78 (4): 687–92.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385370>.

Park, Su Jung, Brian D. Beck, M. Reza Saadatzadeh, Laura S. Haneline, D. Wade Clapp, e Suk Hee Lee. 2011. "Fanconi anemia D2 protein is an apoptotic target mediated by caspases". *Journal of Cellular Biochemistry* 112 (9): 2383–91. doi:10.1002/jcb.23161.

Pinter, A., e M. B. Labruna. 2006. "Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in Cell Culture from the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078 (1): 523–29.  
doi:10.1196/annals.1374.103.

Pinter, Adriano, Ricardo a Dias, Solange M Gennari, e Marcelo B Labruna. 2004. "Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae)." *Journal of medical entomology* 41 (3): 324–32.  
doi:10.1603/0022-2585-41.3.324.

Price, C. T. D., T. Al-Quadani, M. Santic, I. Rosenshine, e Y. Abu Kwaik. 2011. "Host Proteasomal Degradation Generates Amino Acids Essential for Intracellular Bacterial Growth". *Science* 334 (6062): 1553–57.  
doi:10.1126/science.1212868.

Rachinsky, Anna, Felix D. Guerrero, e Glen A. Scoles. 2008. "Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*". *Veterinary Parasitology* 152 (3–4): 294–313.  
doi:10.1016/j.vetpar.2007.12.027.

- Rachinsky, Anna, Felix D Guerrero, e Glen A Scoles. 2007. "Differential protein expression in ovaries of uninfected and Babesia-infected southern cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*." *Insect biochemistry and molecular biology* 37 (12): 1291–1308. doi:10.1016/j.ibmb.2007.08.001.
- Ramphul, Urvashi N., Lindsey S. Garver, Alvaro Molina-Cruz, Gaspar E. Canepa, e Carolina Barillas-Mury. 2015. "*Plasmodium falciparum* evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1423586112.
- Raoult, D, e V Roux. 1997. "Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases". *Clin Microbiol Rev* 10 (4): 694–719. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9336669](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9336669).
- Rego, Meghan A., Frederick W. Kolling IV, Elizabeth A. Vuono, Maurizio Mauro, e Niall G. Howlett. 2012. "Regulation of the Fanconi anemia pathway by a CUE ubiquitin-binding domain in the FANCD2 protein". *Blood* 120 (10): 2109–17. doi:10.1182/blood-2012-02-410472.
- Ren, J., A. Bharti, D. Raina, W. Chen, R. Ahmad, e D. Kufe. 2006. "MUC1 oncoprotein is targeted to mitochondria by heregulin-induced activation of c-Src and the molecular chaperone HSP90". *Oncogene* 25 (1): 20–31. doi:10.1016/j.jpain.2006.01.060.
- Ren, Jian, Naoki Agata, Dongshu Chen, Yongqing Li, Wei-hsuan Yu, Lei Huang, Deepak Raina, Wen Chen, Surender Kharbanda, e Donald Kufe. 2004. "Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents." *Cancer cell* 5 (2): 163–75. doi:10.1126/scitranslmed.3000702.
- Renesto, Patricia, Hiroyuki Ogata, Stéphane Audic, Jean Michel Claverie, e Didier Raoult. 2005. "Some lessons from Rickettsia genomics". *FEMS Microbiology Reviews* 29 (1): 99–117. doi:10.1016/j.femsre.2004.09.002.



- Rikihisa, Yasuko. 2011. "Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*". *Clinical Microbiology Reviews* 24 (3): 469–89. doi:10.1128/CMR.00064-10.
- Ripoll, C M, C E Remondegui, G Ordonez, R Arazamendi, H Fusaro, M J Hyman, C D Paddock, S R Zaki, J G Olson, e C a Santos-Buch. 1999. "Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina." *The American journal of tropical medicine and hygiene* 61 (2): 350–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10463693>.
- Rosa, Rafael D., Janaína Capelli-Peixoto, Rafael D. Mesquita, Sandra P. Kalil, Paula C. Pohl, Glória R. Braz, Andrea C. Fogaça, e Sirlei Daffre. 2016. "Exploring the immune signalling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: From molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge". *Developmental and Comparative Immunology* 59: 1–14. doi:10.1016/j.dci.2015.12.018.
- Rozen, Steve, e Helen Skaletsky. 2000. "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 132: 365–86. doi:10.1385/1-59259-192-2:365.
- Rudel, Thomas, Oliver Kepp, e Vera Kozjak-Pavlovic. 2010. "Interactions between bacterial pathogens and mitochondrial cell death pathways". *Nature Reviews Microbiology*. doi:10.1038/nrmicro2421.
- Rydkina, E., L. C. Turpin, e S. K. Sahni. 2010. "Rickettsia rickettsii Infection of Human Macrovascular and Microvascular Endothelial Cells Reveals Activation of Both Common and Cell Type-Specific Host Response Mechanisms". *Infection and Immunity* 78 (6): 2599–2606. doi:10.1128/IAI.01335-09.
- Schneider, Caroline A, Wayne S Rasband, e Kevin W Eliceiri. 2012. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." *Nature methods* 9 (7): 671–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930834>.
- Segawa, Katsumori, e Shigekazu Nagata. 2015. "An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure". *Trends in Cell Biology* 25 (11). Elsevier Ltd:

639–50. doi:10.1016/j.tcb.2015.08.003.

Severo, Maiara S, Olivia S Sakhon, Anthony Choy, Kimberly D Stephens, e Joao H F Pedra. 2013. “The ‘ubiquitous’ reality of vector immunology”. *Cellular Microbiology* 15 (7): 1070–78. doi:10.1111/cmi.12128.

Soares, J. F., H. S. Soares, A. M. Barbieri, e M.B. Labruna. 2012. “Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever”. *Medical and Veterinary Entomology* 26 (2): 139–51. doi:10.1111/j.1365-2915.2011.00982.x.

Sonenshine, Daniel E. 1991. *Biology of Ticks*. Oxford Uni.

Spencer, R. R., e R R Parker. 1923. “Rocky Mountain Spotted Fever: Infectivity of Fasting and Recently Fed Ticks”. *Public Health Reports (1896-1970)* 38 (8): 333. doi:10.2307/4576667.

Steller, H. 2008. “Regulation of apoptosis in *Drosophila*”. *Cell Death and Differentiation*. doi:10.1038/cdd.2008.50.

Stevens, Joanne M., Edouard E. Galyov, e Mark P. Stevens. 2006. “Actin-dependent movement of bacterial pathogens”. *Nature Reviews Microbiology* 4 (2): 91–101. doi:10.1038/nrmicro1320.

Sultana, Hameeda, Girish Neelakanta, Fred S. Kantor, Stephen E. Malawista, Durland Fish, Ruth R. Montgomery, e Erol Fikrig. 2010. “*Anaplasma phagocytophilum* induces actin phosphorylation to selectively regulate gene transcription in *Ixodes scapularis* ticks”. *The Journal of Experimental Medicine* 207 (8): 1727–43. doi:10.1084/jem.20100276.

Suzuki, Yasuyuki, Yui Nakabayashi, Kazuko Nakata, John C Reed, e Ryosuke Takahashi. 2001. “X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) Inhibits Caspase-3 and -7 in Distinct Modes”. *Journal of Biological Chemistry* 276 (29): 27058–63. doi:10.1074/jbc.M102415200.

Thornberry, Nancy A., e Yuri Lazebnik. 1998. “Caspases: Enemies within”. *Science*. doi:10.1126/science.281.5381.1312.

- Tian, Yanyan, Xi Shen, Rui Wang, Naeh L. Klages-Mundt, Erica J. Lynn, Sara K. Martin, Yin Ye, et al. 2017. "Constitutive role of the Fanconi anemia D2 gene in the replication stress response". *Journal of Biological Chemistry* 292 (49): 20184–95. doi:10.1074/jbc.M117.814780.
- Uchiyama, Tsuneo. 2003. "Adherence to and invasion of Vero cells by recombinant *Escherichia coli* expressing the outer membrane protein rOmpB of *Rickettsia japonica*." *Annals of the New York Academy of Sciences* 990 (junho): 585–90. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07431.x.
- Varma, M G, M Pudney, e C J Leake. 1975. "The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arboviruses". *J Med Entomol* 11 (6): 698–706. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1123829>.
- Villar, Margarita, Nieves Ayllón, Pilar Alberdi, Andrés Moreno, María Moreno, Raquel Tobes, Lourdes Mateos-Hernández, Sabine Weisheit, Lesley Bell-Sakyi, e José de la Fuente. 2015. "Integrated Metabolomics, Transcriptomics and Proteomics Identifies Metabolic Pathways Affected by *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Tick Cells". *Molecular & Cellular Proteomics*. doi:10.1074/mcp.M115.051938.
- Villar, Margarita, Nieves Ayllón, Katherine M. Kocan, Elena Bonzón-Kulichenko, Pilar Alberdi, Edmour F. Blouin, Sabine Weisheit, et al. 2015. "Identification and Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* Proteins Involved in Infection of the Tick Vector, *Ixodes scapularis*". *Plos One* 10 (9): e0137237. doi:10.1371/journal.pone.0137237.
- Vlachou, Dina, Timo Zimmermann, Rafael Cantera, Chris J. Janse, Andrew P. Waters, e Fotis C. Kafatos. 2004. "Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion". *Cellular Microbiology* 6 (7): 671–85. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00394.x.
- Voth, Daniel E, Laura J Broederdorf, e Joseph G Graham. 2012. "Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines". *Future Microbiology* 7 (2): 241–57. doi:10.2217/fmb.11.150.

- Vucic, Domagoj, Vishva M. Dixit, e Ingrid E. Wertz. 2011. "Ubiquitylation in apoptosis: A post-translational modification at the edge of life and death". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi:10.1038/nrm3143.
- Walker, David H., William T. Firth, e Cora-Jean S. Edgell. 1982. "Human endothelial cell culture plaques induced by *Rickettsia rickettsii*". *Infection and Immunity* 37 (1): 301–6.
- Walker, David H, Gustavo a Valbuena, e Juan P Olano. 2003. "Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*." *Annals of the New York Academy of Sciences* 990: 1–11. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07331.x.
- Wei, Xiaolong, Hai Xu, e Donald Kufe. 2005. "Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response". *Cancer Cell* 7 (2): 167–78. doi:10.1016/j.ccr.2005.01.008.
- Weinrauch, Yvette, e Arturo Zychlinsky. 1999. "The Induction of Apoptosis by Bacterial Pathogens". *Annual Review of Microbiology* 53 (1): 155–87. doi:10.1146/annurev.micro.53.1.155.
- Weisheit, Sabine, Margarita Villar, Hana Tykalova, Marina Popara, Julia Loecherbach, Mick Watson, Daniel Ruzek, et al. 2015. "Ixodes scapularis and Ixodes ricinus tick cell lines respond to infection with tick-borne encephalitis virus: transcriptomic and proteomic analysis." *Parasites & vectors* 8 (1): 599. doi:10.1186/s13071-015-1210-x.
- Welch, Matthew D., e Michael Way. 2013. "Arp2/3-Mediated Actin-Based Motility: A Tail of Pathogen Abuse". *Cell Host & Microbe* 14 (3): 242–55. doi:10.1016/j.chom.2013.08.011.
- Woldehiwet, Z., e C. Yavari. 2014. "Anaplasma phagocytophilum up-regulates some anti-apoptotic genes in neutrophils and pro-inflammatory genes in mononuclear cells of sheep". *Journal of Comparative Pathology*. doi:10.1016/j.jcpa.2014.01.005.
- Xia, Jianguo, Nick Psychogios, Nelson Young, e David S. Wishart. 2009. "MetaboAnalyst: A web server for metabolomic data analysis and

interpretation". *Nucleic Acids Research* 37 (SUPPL. 2): 652–60.  
doi:10.1093/nar/gkp356.

Xia, Peng, Yifu Sun, Changjun Zheng, Tingting Hou, Mingyang Kang, e Xiaoyu Yang. 2015. "p53 mediated apoptosis in osteosarcoma MG-63 cells by inhibition of FANCD2 gene expression". *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (7): 11101–8.

Yoshiie, Kiyotaka, Hyung-Yong Kim, Jason Mott, e Yasuko Rikihisa. 2000. "Intracellular Infection by the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent Inhibits Human Neutrophil Apoptosis". *Infection and immunity*. Vol. 68.

Zavala-Castro, Jorge E., Jorge E. Zavala-Velázquez, David H. Walker, Edgar E. Ruiz Arcila, Hugo Laviada-Molina, Juan P. Olano, José a. Ruiz-Sosa, Melissa a. Small, e Karla R. Dzul-Rosado. 2006. "Fatal human infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, Mexico". *Emerging Infectious Diseases* 12 (4): 672–74.  
doi:10.3201/eid1204.051282.

Zhang, Jian Hua, Yingpei Zhang, e Brain Herman. 2003. "Caspases, apoptosis and aging". *Ageing Research Reviews*. doi:10.1016/S1568-1637(03)00026-6.

Zitvogel, Laurence, Oliver Kepp, e Guido Kroemer. 2010. "Decoding Cell Death Signals in Inflammation and Immunity". *Cell* 140 (6): 798–804.  
doi:10.1016/j.cell.2010.02.015.

Zivkovic, Zorica, Edmour F. Blouin, Raúl Manzano-Roman, Consuelo Almazán, Victoria Naranjo, Robert F. Massung, Frans Jongejan, Katherine M. Kocan, e José de la Fuente. 2009. "Anaplasma phagocytophilum and Anaplasma marginale Elicit Different Gene Expression Responses in Cultured Tick Cells". *Comparative and Functional Genomics* 2009: 1–9. doi:10.1155/2009/705034.

**Sítios da internet:**

<https://biologydictionary.net/apoptosis> (Acesso em: 11 de setembro de 2018)

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/fevereiro/02/Casos-confirmados-febre-maculosa.pdf> (Acesso em: 25 de setembro de 2018)

<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/zoonoses/febre-maculosa/dados-estatisticos> (Acesso em: 25 de setembro de 2018)

## ANEXOS

**Tabela suplementar 1.** Proteínas diferencialmente expressas nas células BME26 após 6 h de infecção com *R. rickettsii*.

ID	Peptides	Sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	Foldchange I/C	Name	Class
BME26USP-26177	5	20.9	30.626	3.002	Ca2+-binding actin-bundling protein (spectrin) alpha chain (EF-Hand protein superfamily)	cs
BME26USP-65492	2	12.5	16.18	2.956	ribosomal protein L35a	ps
BME26USP-65807	2	37.5	66.576	2.323	ribosomal protein S29	ps
BME26USP-64008	4	6.6	80.948	2.221	apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus - signalP detected	st/apoptosis
BME26USP-439	2	21.9	14.66	2.178	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2	uc
BME26USP-5003	6	17.8	50.279	2.148	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	pe
BME26USP-63540	3	6.3	79.843	2.124	NADH-ubiquinone oxidoreductase NDUFS1/75 kDa subunit	met/energy
BME26USP-78478	12	63.3	20.255	2.018	heat shock-related protein	pm
BME26USP-69530	6	9	98.341	1.992	Transcription factor CA150 - probable fragment - 24 NetOglyc sites	tf
BME26USP-4447	9	35.6	38.576	1.928	Reticulocalbin calumenin DNA supercoiling factor - signalP detected	st/secreted
BME26USP-60901	3	42.3	10.138	1.885	carboxypeptidase inhibitor precursor - signalP detected	met/aa
BME26USP-48835	2	28.2	81.724	1.852	cytochrome C oxidase subunit VIc	met/energy
BME26USP-62582	3	41.8	92.193	1.835	mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim8	tr
BME26USP-487	6	20.1	33.976	1.834	Uridine phosphorylase	met/nuc
BME26USP-146	10	17.4	105.45	1.828	low-density lipoprotein receptor-related protein 1b - probable fragment	st
BME26USP-75842	4	51.9	8.944	1.805	ribosomal protein S21	ps
BME26USP-245	5	32.2	16.186	1.805	secreted peptide precursor - signalP detected	s/
BME26USP-68614	8	35.9	25.508	1.763	Alternative splicing factor ASF/SF2 (RRM superfamily) - 13 NetOglyc sites	tm
BME26USP-71474	7	48.5	17.523	1.720	Inducible metalloproteinase Ixodes scapularis - signalP detected	s/protease
BME26USP-57878	8	49	21.234	1.671	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - signalP detected	pm
BME26USP-3792	3	29.3	11.106	1.658	small ubiquitin-related modifier 3	prot
BME26USP-67850	8	27.8	40.677	1.653	Y-box-binding protein 2-A - positive regulation of transcription - 15 NetOglyc sites	tm
BME26USP-73476	6	41.7	23.941	1.608	Elongation factor 1 beta/delta chain	tm
BME26USP-SigP-69018	6	10.3	105.41	1.599	Granulins - positive regulation of epithelial cell proliferation - intracellular membrane-bounded organelle - cell death - growth factor - embryo - signalP detected	st/secreted
BME26USP-66203	8	31.3	39.054	1.596	alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein - signalP detected	st/secreted
BME26USP-6552	3	19.3	16.423	1.583	translation initiation inhibitor	ps

BME26USP-SigP-63089	9	71.2	15.452	1.580	Conserved secreted protein precursor - signalP detected	s/ucs
BME26USP-70507	4	46.5	15.89	1.580	Inducible metalloproteinase Ixodes scapularis - signalP detected	s/protease
BME26USP-70965	8	16.8	63.182	1.571	Protein kinase C substrate 80 KD protein heavy chain - signalP detected	st/secreted
BME26USP-24456	5	32.3	15.346	1.556	Nuclear envelope protein lamin intermediate filament superfamily	nr
BME26USP-66155	8	68.8	15.76	1.553	glutathione S-transferase	deto/ox
BME26USP-66350	5	30.2	12.515	1.547	regulatory subunit of protein phosphatase 1 ppz1p and subunit of ppcdc	st
BME26USP-4114	5	27	32.979	1.541	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase	met/int
BME26USP-48516	3	22.2	25.82	1.539	secreted peptide precursor - signalP detected	s/
BME26USP-64852	8	67.8	19.904	1.539	ATP synthase D chain	met/energy
BME26USP-23225	8	56.6	27.079	1.539	Triosephosphate isomerase	met/carb
BME26USP-1981	9	54.8	26.476	1.535	20S proteasome regulatory subunit alpha type PSMA5/PUP2	prot
BME26USP-64873	6	40.4	17.352	1.525	alternative splicing factor SRp20/9G8	tm
BME26USP-75091	2	8.8	44.195	1.520	adhesion regulating molecule - 22 NetOglyc sites	extmat
BME26USP-69523	6	29.6	42.513	1.519	Nucleotide excision repair factor NEF2 RAD23 component - 27 NetOglyc sites	nr
BME26USP-76927	10	55.6	32.685	1.512	DNA replication factor/protein phosphatase inhibitor SET/SPR-2	nr
BME26USP-73548	5	16.6	41.842	1.508	cuticular protein	extmat
BME26USP-SigP-4632	3	46.1	11.208	1.508	hypothetical secreted protein precursor	s/uk
BME26USP-71952	4	34.2	16.663	1.506	actin-related protein arp2/3 complex subunit arpc5	cs
BME26USP-63579	5	11.8	71.933	1.504	nuclear receptor coactivator 5 strongylocentrotus purpuratus	tf
BME26USP-61580	24	62.3	50.352	1.504	Nuclear envelope protein lamin intermediate filament superfamily - probable fragment	nr
BME26USP-74994	4	45.7	13.89	1.503	ribosomal protein	ps
BME26USP-4946	3	10.2	44.715	0.680	Isocitrate dehydrogenase alpha subunit	met/aa
BME26USP-63159	6	9.1	104.81	0.680	Vesicle coat complex AP-1 gamma subunit	pe
BME26USP-4721	4	19.8	37.789	0.676	Malate dehydrogenase	met/energy
BME26USP-63472	12	38	65.056	0.676	Beta-N-acetylhexosaminidase - signalP detected	met/carb
BME26USP-74743	4	28	28.214	0.672	Hypothetical protein	uc
BME26USP-64420	8	24.8	59.163	0.671	chaperonin	pm
BME26USP-77308	2	12.2	21.646	0.670	60S ribosomal protein L11	ps
BME26USP-SigP-2770	6	24.7	39.898	0.668	secreted salivary gland peptide - signalP detected	s/mucin
BME26USP-76029	4	22.8	18.324	0.664	60S ribosomal protein L22	ps
BME26USP-65609	5	31.9	28.384	0.661	20S proteasome regulatory subunit beta type PSMB4/PRE4	prot
BME26USP-65869	6	30.1	38.219	0.659	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase/dihydroxyacetone 3-phosphate reductase	met/energy
BME26USP-68205	7	18.6	54.27	0.655	Cuticle collagen 34 - probable fragment - 17 NetOglyc sites	extmat
BME26USP-82	13	33	65.176	0.655	Protein phosphatase 2A regulatory subunit A - probable fragment	st



BME26USP-5100	5	18.6	41.606	0.654	Dihydrolipoamide succinyltransferase (2-oxoglutarate dehydrogenase E2 subunit) - probable fragment - 13 NetOglyc sites	met/energy
BME26USP-59029	25	60.5	68.716	0.652	Bifunctional ATP sulfurylase/adenosine 5'-phosphosulfate kinase	met/nuc
BME26USP-75222	24	67.3	49.929	0.651	Alpha tubulin	cs
BME26USP-2915	6	34.2	44.89	0.646	conserved secreted protein precursor - signalP detected	s/
BME26USP-65354	2	9.4	37.156	0.642	serine hydrolase-like - hydrolase - cytoplasmic membrane-bounded vesicle - peroxisome - mitochondrion - cytoplasm	pe
BME26USP-69508	9	46.6	29.207	0.642	complement component 1 q subcomponent binding protein/mrna splicing factor sf2 subunit p32	tm
BME26USP-36470	1	22.6	73.431	0.641	abc transporter c family member	tr
BME26USP-58915	6	28.7	41.283	0.639	Zn2+-binding dehydrogenase (nuclear receptor binding factor-1) - signalP detected	tm
BME26USP-61615	5	19.9	40.429	0.633	heat shock protein	pm
BME26USP-22908	6	42.5	25.1	0.631	glutathione S-transferase	detox
BME26USP-665	4	13.4	44.969	0.631	Predicted GTPase	ps
BME26USP-4924	5	31.9	26.614	0.631	Mitochondrial/plastidial beta-ketoacyl-ACP reductase	met/lipd
BME26USP-7932	7	38.2	36.504	0.629	Isocitrate dehydrogenase gamma subunit	met/aa
BME26USP-2720	12	24	96.654	0.626	Karyopherin (importin) beta 1	ne
BME26USP-2281	10	42.5	51.513	0.625	Alcohol dehydrogenase class IV	met/energy
BME26USP-75529	13	60.8	32.18	0.624	Hypothetical protein	uc
BME26USP-70032	4	11.4	62.709	0.609	Translation elongation factor EF-1 alpha/Tu - probable fragment	ps
BME26USP-74843	17	48	57.588	0.604	chaperonin complex component tcp-1 beta subunit cct2	pm
BME26USP-4251	9	24.3	67.082	0.604	Electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase	met/energy
BME26USP-76046	8	46.5	33.881	0.604	Enoyl-CoA isomerase	met/lipd
BME26USP-69448	7	8.6	129.52	0.604	zinc carboxypeptidase partial - signalP detected	s/protease
BME26USP-67995	12	31.9	63.977	0.599	Succinate dehydrogenase assembly factor 2-A - probable fragment	met/energy
BME26USP-61387	4	60.4	12.578	0.599	Vesicle coat complex AP-3 beta subunit	pe
BME26USP-64749	13	24.9	103.08	0.598	late endosomal/lysosomal adaptor	pm/protease
BME26USP-77632	4	47.2	13.258	0.598	DNA replication licensing factor MCM4 component - probable fragment	nr
BME26USP-75524	12	31	63.956	0.587	NAD dependent epimerase - probable fragment	uc
BME26USP-4774	6	35.7	32.566	0.586	40S ribosomal protein S13	ps
BME26USP-76789	2	18.5	17.267	0.584	Predicted quinone oxidoreductase	met/energy
BME26USP-77627	5	23.9	40.201	0.579	Toll-interacting protein - innate immune response - Toll-like receptor binding - kinase binding - phosphorylation - signal transduction	st
BME26USP-972	3	34.7	30.988	0.571	4-aminobutyrate aminotransferase - probable fragment	met/aa
BME26USP-63523	5	23.1	36.641	0.571	chaperonin protein	pm
BME26USP-48817	14	38.7	57.67	0.567	Vacuolar sorting protein VPS1 dynamin	pe
BME26USP-78480	5	16.1	75.427	0.565	heat shock-related protein	pm

BME26USP-69438	3	36.5	14.564	0.563	nad+ adp-ribosyltransferase-3-like protein strongylocentrotus purpuratus partial	met/carb
BME26USP-55655	13	10.2	228.77	0.557	protoporphyrinogen oxidase partial - probable fragment	met/int
BME26USP-23319	4	60	11.855	0.557	atp-dependent lon protease atp-dependent lon protease	pm/protease
BME26USP-SigP-3602	5	6.8	111.15	0.555	pancreatic lipase-like enzyme partial - signalP detected	s/met
BME26USP-77870	8	25.6	46.856	0.552	ATP-dependent DNA ligase IV - probable fragment	nr
BME26USP-70123	13	22.6	105.37	0.546	Sirtuin 5 - probable fragment	nr
BME26USP-68077	4	31	26.356	0.545	lyase partial	uc
BME26USP-58773	5	25.9	32.713	0.536	Serpin - signalP detected	imm/secreted
BME26USP-71918	11	38.5	45.076	0.535	Actin-related protein Arp2/3 complex subunit Arp2	cs
BME26USP-76444	9	42.1	47.237	0.532	Acetyl-CoA carboxylase - probable fragment	met/lipd
BME26USP-1319	7	9.8	128.09	0.531	Translocase of outer mitochondrial membrane complex subunit TOM70/TOM72 - probable fragment	pe
BME26USP-73147	9	21.4	63.19	0.530	Dihydrolipoamide dehydrogenase	met/energy
BME26USP-3827	3	14.1	49.703	0.527	Mucin-1 - negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator - positive regulation of - 22 NetOglyc sites	st/apoptosis
BME26USP-26000	3	31.3	25.189	0.524	Ribosome biogenesis protein - Nop58p/Nop5p	tm
BME26USP-67136	10	37.4	54.613	0.523	oligopeptidase	pm/protease
BME26USP-1465	7	16.2	81.26	0.519	GTP-binding protein SEC4 small G protein superfamily	st
BME26USP-64181	7	49.5	23.01	0.512	secreted peptide precursor - signalP detected	s/mucin
BME26USP-2688	3	13	34.51	0.508	GDP dissociation inhibitor - microtubule associated complex - protein transport - Rab GDP-dissociation inhibitor - synaptic vesicle	cs
BME26USP-66219	8	27.8	49.787	0.501	alkaline phosphatase protein partial - signalP detected	st/secreted
BME26USP-70999	9	34.3	58.653	0.495	Glutaredoxin-related protein - probable fragment	pm
BME26USP-4897	7	32.8	38.386	0.487	Actin-related protein Arp2/3 complex subunit ARPC1/p41-ARC	cs
BME26USP-78600	10	54	42.062	0.485	40S ribosomal protein S7	ps
BME26USP-2770	6	45.5	22.187	0.480	Trypsin	met/aa
BME26USP-SigP-61894	5	30.3	27.981	0.479	thimet oligopeptidase	pm/protease
BME26USP-66528	8	15.6	85.026	0.478	Fructose-16-bisphosphatase	met/carb
BME26USP-64301	7	30.8	36.688	0.470	26S proteasome regulatory complex ATPase RPT6	prot
BME26USP-SigP-3855	11	37.4	47.97	0.467	Mitochondrial phosphate carrier protein	met/energy
BME26USP-48760	4	37	19.724	0.458	Metalloexopeptidases	met/aa
BME26USP-2145	7	21.4	53.453	0.452	Hypothetical protein partial	uc
BME26USP-75430	7	11.3	85.658	0.447	Protein Nlrc3-ps1 - negative regulation of NF-kappaB transcription factor - I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling - cytoplasm - ATP binding	st

BME26USP-76240	4	19.8	45.747	0.445	regulator of chromosome condensation 1 - nucleolus - spindle assembly - histone binding - nuclear membrane - nucleosomal DNA binding	nr
BME26USP-3901	4	15	46.108	0.444	Cholesterol transport protein (Niemann-Pick C disease protein) - probable fragment	met/lipd
BME26USP-26691	2	3	123.65	0.440	Apurinic/aprimidinic endonuclease	nr
BME26USP-78162	4	19.2	36.202	0.437	chaperonin chaperonin	pm
BME26USP-75557	8	25.5	58.992	0.427	20S proteasome regulatory subunit alpha type PSMA2/PRE8	prot
BME26USP-61261	5	39.3	25.793	0.422	vesicle-fusing atpase 2 - probable fragment	pe
BME26USP-4793	4	33	22.418	0.422	40S ribosomal protein S15	ps
BME26USP-75020	3	36.3	16.817	0.397	Ribosomal protein S7	ps
BME26USP-1236	7	55.2	23.356	0.395	ADP/ATP translocase - probable fragment	tr
BME26USP-65733	4	50	89.844	0.390	Branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complex alpha subunit	met/energy
BME26USP-65079	3	12.3	47.865	0.387	Deoxyribonuclease II - signalP detected	s/met/nuc
BME26USP-5096	3	9.8	51.784	0.381	Vesicle coat complex COPI gamma subunit	pe
BME26USP-51823	7	14	95.004	0.377	abc transporter c family member - probable fragment	tr
BME26USP-72524	4	61.6	97.427	0.374	ubiquinone oxidoreductase NDUFV1/51kDa subunit	met/energy
BME26USP-3711	5	23.5	52.126	0.349	Karyopherin (importin) alpha	pe
BME26USP-4452	5	17.1	54.236	0.286	Syntenin-1 - extracellular vesicular exosome - cell adhesion molecule binding - protein N-terminus binding - protein heterodimerization - ephrin	pe

Apenas as proteínas com *p-value* < 0,05 e FDR < 5 % estão apresentadas, com abundância relativa (*Foldchange*) entre  $\geq 1,5$  (vermelho) e  $\leq 0,67$  (verde). **cs**: citoesquelético; **detox/ox**: desintoxicação/oxidação; **detox**: desintoxicação; **extmat**: matriz extracelular; **imm**: imunidade; **met/aa**: metabolismo de aa; **met/carb**: metabolismo de carboidrato; **met/energia**: metabolismo de energia; **met/int**: metabolismo intermediário; **met/lipd**: metabolismo lipídico; **met/nuc**: metabolismo de nucleotídeos; **ne**: exportação nuclear; **nr**: regulação nuclear; **pe**: exportação de proteína; **pm**: modificação de proteína; **prot**: maquinaria de proteossoma; **ps**: síntese de proteína; **s/**: secretadas; **s/protease**: proteases; **s/proteinh**: inibidor de proteases; **st/apoptose**: apoptose e transdução de sinal; **st**: transdução de sinal; **te**: elementos de transposição; **tf**: fator de transcrição; **tm**: maquinaria de transcrição; **tr**: canais e transportadores; **uc**: desconhecida conservada; **uk**: desconhecida.

**Tabela suplementar 2.** Proteínas exclusivamente identificadas em células BME26 não infectadas (controle) no tempo de 6 h.

ID	Peptides	Sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	Name	Class
BME26USP-1958	3	19.7	35.488	Nucleoside hydrolases similar to the inosine-adenosine-guanosine-preferring nucleoside hydrolase from <i>Caenorhabditis elegans</i>	met/nuc
BME26USP-23398	1	3.3	104.44	ubiquitin c-terminal hydrolase posttranslational modification partial	prot
BME26USP-25718	2	20.8	16.773	cell adhesion molecule binding protein	extmat
BME26USP-25735	2	14.7	31.74	S-adenosylhomocysteine hydrolase - probable fragment	met/int
BME26USP-25990	2	6.1	57.275	Dynein light intermediate chain - 17 NetOglyc sites	cs
BME26USP-27005	4	10.8	57.801	Medium subunit of clathrin adaptor complex	pe
BME26USP-3442	2	7.9	35.143	Uncharacterized conserved protein	uc
BME26USP-4174	3	6.4	74.398	Sterol reductase/lamin B receptor - probable fragment - 30 NetOglyc sites	met/lipid
BME26USP-4263	1	3.5	58.628	CDK5 activator-binding protein	st
BME26USP-42758	2	19.6	12.394	Vinculin - neuron projection morphogenesis - phagocytosis - actin cytoskeleton - structural molecule - actin binding - cytoskeletal anchoring at - probable fragment	cs
BME26USP-4311	3	9.8	45.807	adp-ribosylglycohydrolase posttranslational modification partial	ps
BME26USP-4440	2	3.8	102.85	Vitronectin receptor alpha subunit - probable fragment	extmat
BME26USP-4457	4	4.8	102.83	Vesicle coat complex AP-1 gamma subunit	pe
BME26USP-4501	2	5.5	80.201	prolyl endopeptidase prolyl oligopeptidase prolyl endopeptidase prolyl oligopeptidase	pm/protease
BME26USP-4568	2	27.4	18.276	ubiquinone oxidoreductase b16.6 subunit/cell death-regulatory protein partial	st/apoptosis
BME26USP-4752	6	45.8	20.906	Rho	cs
BME26USP-4878	2	6.8	42.147	Staufen	pe
BME26USP-4899	4	33.6	25.959	20S proteasome regulatory subunit beta type PSMB1/PRE7	prot
BME26USP-5140	6	27.5	35.646	Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase (D-isomer-specific 2-hydroxy acid dehydrogenase superfamily)	met/energy
BME26USP-51461	1	32.9	7.076	glutamate carboxypeptidase - probable fragment	pm/protease
BME26USP-5320	2	3.4	118.41	Vesicle coat complex COPII subunit SEC24/subunit SFB2 - probable fragment	pe
BME26USP-5365	2	7.9	53.325	mitochondrial 28s ribosomal protein s27	ps
BME26USP-58858	2	9.5	44.875	Pentatricopeptide repeat-containing protein 2	cs
BME26USP-58921	3	5	98.09	DNA replication licensing factor MCM5 component - probable fragment	nr
BME26USP-60801	1	12.9	23.085	rna polymerase ii large subunit	tm
BME26USP-62031	5	42.4	21.259	Cdc42 homolog - positive regulation of protein kinase - maintenance of protein location - adherens junction - molecular_function	st
BME26USP-62454	2	26.7	18.563	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase V0 sector subunit d	tr

BME26USP-62502	3	25.6	13.262	NADH dehydrogenase ubiquinone 1 alpha subcomplex subunit 5 - respiratory electron transport chain - oxidoreductase	met/energy
BME26USP-62600	3	18.1	24.311	nad+ adp-ribosyltransferase parp required for poly-adp ribosylation of nuclear	met/carb
BME26USP-62931	2	7.6	31.674	mitochondrial ribosomal protein l9	ps
BME26USP-62948	2	11.8	30.911	Replication factor C subunit RFC3	met/energy
BME26USP-62954	1	24.5	56.284	stretch regulated skeletal muscle protein	cs
BME26USP-62963	2	9.1	46.258	S-adenosylmethionine synthetase	met/int
BME26USP-62986	4	6.5	124.46	Protein containing adaptin N-terminal region - probable fragment	ps
BME26USP-63008	2	13.1	32.436	Golgi protein	pe
BME26USP-63169	3	11.9	48.135	secreted peptide precursor - signalP detected	s/
BME26USP-63504	2	7.1	51.465	eukaryotic translation initiation factor 5-like isoform 1	ps
BME26USP-64180	2	9.1	32.44	Translation initiation factor 3 subunit g (eIF-3g)	ps
BME26USP-65250	7	12.3	89.203	ATP-dependent RNA helicase - probable fragment	tm
BME26USP-65523	2	6.6	60.266	Apoptosis inhibitor 5/fibroblast growth factor 2-interacting factor 2	st
BME26USP-65597	2	5.5	43.001	39s ribosomal protein l39	ps
BME26USP-66072	2	25.8	24.984	Protein involved in vacuolar protein sorting	pe
BME26USP-66273	3	10.5	49.222	Cysteine desulfurase NFS1	met/aa
BME26USP-67166	3	36.4	12.333	synaptic vesicle-associated integral membrane protein partial - probable fragment	pe
BME26USP-67170	2	21.1	18.757	Mitochondrial solute carrier protein - probable fragment	met/energy
BME26USP-67438	1	2.6	77.719	Mitogen inducible gene product (contains ERM and PH)	nr
BME26USP-67450	2	11.1	21.873	Vacuolar assembly/sorting protein DID2	pe
BME26USP-68089	2	11.8	46.19	Mitochondrial ribosome small subunit component mediator of apoptosis DAP3 - probable fragment	ps
BME26USP-71268	4	7.5	107.6	translation initiation factor 3 subunit s8 protein	ps
BME26USP-71315	2	10.8	42.21	ubiquinone oxidoreductase NDUFA9/39kDa subunit	met/energy
BME26USP-72075	2	2.6	73.407	wd repeat-containing protein 91	uc
BME26USP-72306	2	23.1	75.295	secreted salivary gland peptide - probable fragment	s/
BME26USP-72706	4	33.5	24.547	Dihydrofolate reductase	met/int
BME26USP-72786	4	5	130.02	Chromatin remodeling factor subunit - probable fragment - 23 NetOglyc sites	nr
BME26USP-73313	4	25.5	28.195	hypothetical protein	uc
BME26USP-73613	2	6.3	72.765	Pristanoyl-CoA/acyl-CoA oxidase	met/lipid
BME26USP-74870	2	8.2	70.494	Clathrin assembly protein AP180 - 13 NetOglyc sites	st
BME26USP-75315	2	11.4	39.773	Lachesin - plasma membrane - cell adhesion involved in heart morphogenesis - protein homodimerization - septate junction assembly - morphogenesis of - signalP detected	extmat
BME26USP-76690	2	12.8	46.048	Cdk activating kinase (CAK)/RNA polymerase II transcription initiation/nucleotide excision repair factor TFIIH/TFIIC - probable fragment - 11 NetOglyc sites	nr

BME26USP-77519	2	9.8	45.631	26S proteasome regulatory complex subunit RPN10/PSMD4	prot
BME26USP-77773	3	8.4	54.694	microtubule-actin cross-linking factor 1 - 26 NetOglyc sites	cs
BME26USP-78170	4	6.3	95.64	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase V0 sector subunit a	tr
BME26USP-78465	5	22.6	37.566	Hypothetical protein - 12 NetOglyc sites	uc
BME26USP-7923	3	43.6	19.273	tumor necrosis factor-mediated signaling pathway	imm
BME26USP-8003	1	16.8	12.039	ubiquinone oxidoreductase NDUFS5/15kDa	met/energy
BME26USP-SigP-1812	4	17.6	48.269	Chitinase - signalP detected	met/carb
BME26USP-SigP-22884	1	6.4	31.874	endonuclease partial - probable fragment - signalP detected	s/met/nuc

**cs:** citoesquelético; **detox/ox:** desintoxicação/oxidação; **detox:** desintoxicação; **extmat:** matriz extracelular; **imm:** imunidade; **met/aa:** metabolismo de aa; **met/carb:** metabolismo de carboidrato; **met/energia:** metabolismo de energia; **met/int:** metabolismo intermediário; **met/lipd:** metabolismo lipídico; **met/nuc:** metabolismo de nucleotídeos; **ne:** exportação nuclear; **nr:** regulação nuclear; **pe:** exportação de proteína; **pm:** modificação de proteína; **prot:** maquinaria de proteossoma; **ps:** síntese de proteína; **s/:** secretadas; **s/protease:** proteases; **s/protinh:** inibidor de proteases; **st/apoptose:** apoptose e transdução de sinal; **st:** transdução de sinal; **te:** elementos de transposição; **tf:** fator de transcrição; **tm:** maquinaria de transcrição; **tr:** canais e transportadores; **uc:** desconhecida conservada; **uk:** desconhecida.

**Tabela suplementar 3.** Proteínas exclusivamente identificadas em células BME26 infectadas por *R. rickettsii* no tempo de 6 h.

ID	Peptides	Sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	Name	Class
BME26USP-1128	1	10.2	20.791	member of chemokine-like factor super family - 15 NetOglyc sites	imm
BME26USP-150	5	3.8	241.08	DNA/RNA helicase MER3/SLH1 DEAD-box superfamily - probable fragment	tm
BME26USP-23200	3	10.9	55.761	leucine aminopeptidase	pm/protease
BME26USP-23267	1	4.4	31.704	hypothetical conserved secreted protein 178	s/
BME26USP-23285	2	8.9	35.519	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase-associated protein	met/aa
BME26USP-23320	3	18.7	19.372	Nucleoside diphosphate kinase - signalP detected	met/nuc
BME26USP-23402	3	12.9	45.586	mitochondrial ribosomal protein	ps
BME26USP-25535	2	5.3	48.286	Chitinase - signalP detected	met/carb
BME26USP-25820	2	10.4	36.176	plasma membrane calcium-transporting atpase 3-like isoform 3 partial - probable fragment	tr
BME26USP-269	2	7.7	39.897	Mucin-5AC - cellular protein metabolic process - post-translational protein modification - extracellular fibril organization - fibril - O-glycan - 42 NetOglyc sites	ps
BME26USP-2786	2	1.2	205.07	RNA polymerase I large subunit - probable fragment - 181 NetOglyc sites	tm
BME26USP-3245	2	30.9	14.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4 - preribosome - protein folding - rRNA processing - spindle - cytoplasm - nucleolus	ps
BME26USP-3369	2	11.8	27.779	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase - probable fragment	met/energy
BME26USP-3507	1	2.1	143.92	Nuclear pore complex Nup155 component (D Nup154 sc Nup157/Nup170)	ne
BME26USP-3738	2	9.9	35.748	Predicted dehydrogenase - signalP detected	detox
BME26USP-3932	2	11.5	35.903	Golgi reassembly stacking protein GRASP65 contains PDZ domain - 24 NetOglyc sites	pe
BME26USP-4068	2	19.2	18.408	members of chemokine-like factor super family	imm
BME26USP-436	3	14.6	32.894	sulfotransferase	detox
BME26USP-4383	1	5.7	25.527	hypothetical protein	uc
BME26USP-4403	2	5	83.185	mRNA catabolic process - RNA processing - polyribonucleotide nucleotidyltransferase - RNA binding - 3'-5'-exoribonuclease	tm
BME26USP-4426	2	3	87.056	Highly conserved protein containing a thioredoxin domain Posttranslational modification	pm
BME26USP-4511	1	10.4	28.845	Predicted actin-bundling protein	cs
BME26USP-45440	1	22	70.293	ribosomal protein L24	ps
BME26USP-4563	1	7.3	42.728	Mitochondrial ribosomal protein S28	ps
BME26USP-4621	2	18.1	16.9	THO complex 7 - nuclear speck - transport - nucleus - mRNA transport - RNA splicing - cytoplasm - probable fragment	tm
BME26USP-48589	3	19.8	29.13	tick salivary thyropin - signalP detected	s/proteinh

BME26USP-48775	1	5.2	43.879	glutathione s-transferase	detox
BME26USP-48926	2	7.2	53.461	Serine/threonine protein kinase Chk2 - probable fragment	nr
BME26USP-51361	1	22.2	69.097	kinesin complex - microtubule motor	cs
BME26USP-5191	3	16.5	24.552	rna polymerase i transcription factor uaf	tm
BME26USP-5339	3	10.6	33.726	Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 11 - signalP detected	detox
BME26USP-56274	1	33	98.624	Hypothetical protein	uc
BME26USP-57889	1	6.7	19.947	Uncharacterized conserved nuclear protein	nr
BME26USP-58259	2	8.5	37.985	serine/threonine-protein kinase mig-15-like - probable fragment - 17 NetOglyc sites	st
BME26USP-61237	1	16	11.013	secreted protein precursor - signalP detected	s/
BME26USP-61329	2	6.2	46.8	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b	st
BME26USP-61379	4	26.4	30.425	26S proteasome regulatory complex subunit RPN12/PSMD8	prot
BME26USP-61464	2	8.1	49.559	26S proteasome regulatory complex ATPase RPT5	prot
BME26USP-61492	2	5.1	90.441	Membrane trafficking and cell signaling protein HRS contains VHS and FYVE - 20 NetOglyc sites	st
BME26USP-61854	1	11.5	29.239	Hypothetical protein	uc
BME26USP-61917	1	3.9	40.829	nuclear membrane organization - protein homooligomerization - chaperone mediated protein folding requiring cofactor	pm
BME26USP-61939	3	18	28.825	Conserved secreted protein precursor - signalP detected	s/uc
BME26USP-61972	1	9.3	22.486	hypothetical secreted protein 790 - signalP detected	s/
BME26USP-62172	1	9.1	18.816	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein Ixodes scapularis - probable fragment	pe
BME26USP-62756	1	4.4	38.401	ubiquitin regulatory protein	prot
BME26USP-62971	1	16	13.29	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase V1 sector subunit F	tr
BME26USP-62997	3	23.7	18.848	RNA polymerase II general transcription factor BTF3	tf
BME26USP-63023	1	14.9	13.331	ubiquinone oxidoreductase NDUFB3/B12 subunit	met/energy
BME26USP-63407	3	17.3	32.92	proteasome inhibitor	prot
BME26USP-63526	3	4.8	119.7	Nuclear transport receptor RANBP7/RANBP8 (importin beta superfamily)	ne
BME26USP-63618	2	16.6	19.779	Vesicle coat complex COPI zeta subunit	pe
BME26USP-63674	4	16.3	43.89	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit m partial	ps
BME26USP-63830	1	4.8	44.046	Monoacylglycerol lipase ABHD12 - Membrane anchor detected	met/lipd
BME26USP-63971	2	4.7	66.587	Endosomal membrane EMP70 - signalP detected	pe
BME26USP-64410	2	11.1	35.58	sulfotransferase partial	detox
BME26USP-64465	5	32.7	22.497	Uridylate kinase/adenylate kinase	met/nuc
BME26USP-65185	8	10.4	143.52	retinitis pigmentosa GTPase regulator - eye photoreceptor cell development - cilium assembly - intraciliary transport - sperm flagellum - ciliary - probable fragment	st
BME26USP-65473	3	12.2	48.651	Signal transducing adaptor protein STAM/STAM2	st
BME26USP-65504	5	14.7	61.022	Ran GTPase-activating protein	tm
BME26USP-65718	5	31.3	29.821	chloride intracellular channel 6-like protein	tr



BME26USP-65762	2	23.4	18.93	translocon-associated complex trap delta subunit - signalP detected	pe
BME26USP-65769	2	3.8	100.42	Nuclear transport receptor Karyopherin-beta2/Transportin (importin beta superfamily)	ne
BME26USP-65867	3	39.4	11.782	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase/dihydroxyacetone 3-phosphate reductase - probable fragment	met/energy
BME26USP-66001	1	15.2	16.407	60S ribosomal protein L27	ps
BME26USP-66205	1	21.5	12.615	C-Myc-binding protein - regulation of transcription	tm
BME26USP-66209	2	1.4	263.42	nucleoporin partial - probable fragment - 24 NetOglyc sites	ne
BME26USP-66748	1	3.3	50.906	Integrin-linked kinase	st
BME26USP-66878	1	9.7	25.765	glutathione S-transferase kappa	detox
BME26USP-67040	2	3.5	110.08	DNA topoisomerase I - probable fragment	nr
BME26USP-67167	1	7.4	17.391	Mitochondrial solute carrier protein	met/energy
BME26USP-67173	2	14.8	17.609	salivary selenoprotein precursor - signalP detected	detox/ox
BME26USP-67195	2	38.4	13.174	eukaryotic translation initiation factor 4e binding protein 1 - 20 NetOglyc sites	ps
BME26USP-67403	3	7	92.468	Nuclear cap-binding complex subunit NCBP1/CBP80	tm
BME26USP-67744	2	18.4	22.525	hypothetical secreted protein 790 - signalP detected	s/
BME26USP-67891	5	19.6	44.964	26S proteasome regulatory complex subunit RPN7/PSMD6	prot
BME26USP-68132	3	12.5	40.156	protein kinase activator - kinase binding - protein serine/threonine kinase	st
BME26USP-68401	2	7.9	46.212	cop9 signalosome subunit csn4	pe
BME26USP-69612	4	8.6	80.888	glycyl-trna synthetase	uc
BME26USP-69942	2	20	11.373	40S ribosomal protein S16 - probable fragment	ps
BME26USP-70058	3	12.6	46.242	WD40 domain	st
BME26USP-70300	4	12.4	53.159	26S proteasome regulatory complex subunit RPN5/PSMD12	prot
BME26USP-70948	1	6.1	38.283	metal ion binding - regulation of transcription - probable fragment - 12 NetOglyc sites	tm
BME26USP-71823	2	8.2	19.126	microtubule-binding protein	cs
BME26USP-72268	2	16.2	28.447	Zinc-binding oxidoreductase - probable fragment	met/energy
BME26USP-72915	3	11.9	28.078	Adenylate kinase	met/nuc
BME26USP-73466	2	14.9	18.312	mitochondrial ribosomal protein l18	ps
BME26USP-73569	2	10.1	55.905	Serine/threonine specific protein phosphatase PP1 catalytic subunit	st
BME26USP-73927	1	1.8	58.376	Equilibrative nucleoside transporter protein - 22 NetOglyc sites	tr
BME26USP-74142	4	14	43.856	Trypsin - probable fragment - 22 NetOglyc sites	met/aa
BME26USP-74554	4	14.2	45.108	molecular chaperone	pm
BME26USP-74680	1	4.3	45.164	Protein transporter of the TRAM (translocating chain-associating membrane) superfamily	pe
BME26USP-76175	2	3.9	97.067	Vacuolar sorting protein VPS1 dynamin	pe
BME26USP-76186	1	12.9	23.777	vesicle coat protein clathrin light chain	pe
BME26USP-76244	3	8.4	45.848	P2X receptor	st
BME26USP-76977	1	4.8	39.854	Cytochrome P450 CYP3/CYP5/CYP6/CYP9 subfamilies - probable fragment	detox/ox
BME26USP-77140	2	30.5	10.02	cytochrome c oxidase subunit vib/cox12	met/energy

BME26USP-77172	2	32.6	10.313	heat shock factor binding protein 1	pm
BME26USP-77693	2	2.3	148.18	Splicing factor 3b subunit 1 - 20 NetOglyc sites	tm
BME26USP-77785	4	15.2	61.937	Thiamine pyrophosphate-requiring enzyme	met/aa
BME26USP-78073	1	12.7	11.516	microsomal signal peptidase 12 kDa subunit - Membrane anchor detected	pe
BME26USP-78215	3	3.3	132.79	pitrilysin metalloproteinase 1 isoform cra c - probable fragment	pm/protease
BME26USP-78479	2	11.6	20.318	der and-287 heat shock-related protein	pm
BME26USP-78536	3	11.2	34.145	Lipid phosphate phosphatase	met/lipd
BME26USP-7927	4	22.6	25.772	Ran-specific GTPase-activating protein - intracellular transport - positive regulation of mitotic centrosome separation - viral process - Ran GTPase	st
BME26USP-799	2	5.7	77.233	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1 partial - probable fragment	s/
BME26USP-8424	2	18.4	25.475	vitronectin receptor alpha subunit partial - probable fragment - 12 NetOglyc sites	st
BME26USP-9884	2	53.8	56.894	vitronectin receptor alpha subunit partial - probable fragment	st
BME26USP-SigP-23019	2	7.5	43.083	translational activator gcn1 translational activator gcn1 - probable fragment	ps
BME26USP-SigP-61341	3	5.4	89.993	dnaj domain prokaryotic heat shock protein - signalP detected	pm
BME26USP-SigP-62431	5	8.2	113.75	nucleoporin - probable fragment - 42 NetOglyc sites	ne
BME26USP-SigP-65161	1	2.4	115.07	cell adhesion molecule - probable fragment - signalP detected	extmat
BME26USP-SigP-69438	4	7.3	84.256	nad+ adp-ribosyltransferase-3-like protein strongylocentrotus purpuratus partial - probable fragment - signalP detected	met/carb
BME26USP-SigP-74141	5	14.1	58.34	secreted salivary gland peptide - probable fragment - signalP detected	s/
BME26USP-SigP-75480	3	2.9	133.37	tyrosine protein kinase receptor tie-1 - signalP detected	st/secreted
BME26USP-SigP-77199	2	7.8	51.539	beta-13-glucosyltransferase - signalP detected	met/carb
BME26USP-SigP-844	3	13.9	53.03	serine carboxypeptidase cpvl partial - signalP detected	s/protease

**cs:** citoesquelético; **detox/ox:** desintoxicação/oxidação; **detox:** desintoxicação; **extmat:** matriz extracelular; **imm:** imunidade; **met/aa:** metabolismo de aa; **met/carb:** metabolismo de carboidrato; **met/energia:** metabolismo de energia; **met/int:** metabolismo intermediário; **met/lipd:** metabolismo lipídico; **met/nuc:** metabolismo de nucleotídeos; **ne:** exportação nuclear; **nr:** regulação nuclear; **pe:** exportação de proteína; **pm:** modificação de proteína; **prot:** maquinaria de proteossoma; **ps:** síntese de proteína; **s/:** secretadas; **s/protease:** proteases; **s/proteinh:** inibidor de proteases; **st/apoptose:** apoptose e transdução de sinal; **st:** transdução de sinal; **te:** elementos de transposição; **tf:** fator de transcrição; **tm:** maquinaria de transcrição; **tr:** canais e transportadores; **uc:** desconhecida conservada; **uk:** desconhecida.

**Tabela suplementar 4.** Proteínas diferencialmente expressas nas células BME26 após 48 h de infecção com *R. rickettsii*.

ID	Peptides	Sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	Foldchange I/C	Name	Class
BME26USP-23092	1	17.2	15.612	3.903	Unknown product - 28 NetOglyc sites	uk
BME26USP-52476	1	27.7	50.217	3.503	Unknown product	uk
BME26USP-48595	3	36.2	12.554	2.976	Macrophage migration inhibitory factor	imm
BME26USP-65666	10	45.1	18.733	2.425	TPA_exp: hypothetical secreted protein 1652 - probable fragment	s/
BME26USP-60347	10	71.5	19.136	2.031	Unknown product	uk
BME26USP-17911	5	79	90.822	1.839	Orbivirus VP4 core protein - probable fragment	te
BME26USP-67195	2	38.4	13.174	1.807	eukaryotic translation initiation factor 4e binding protein 1 - 20 NetOglyc sites	ps
BME26USP-34884	3	51	58.785	1.753	Unknown product	uk
BME26USP-73785	7	46.1	23.415	1.706	Transcription factor containing NAC and TS-N	tf
BME26USP-68301	6	36.6	30.957	1.653	20S proteasome regulatory subunit alpha type PSMA1/PRE5	prot
BME26USP-65989	4	39.3	14.777	1.647	60S ribosomal protein L14/L17/L23	ps
BME26USP-57486	9	50.3	20.31	1.626	small heat shock protein ii	pm
BME26USP-61576	6	40.6	26.457	1.605	THO complex subunit 4 - exon-exon junction complex - nucleolus - catalytic step 2 spliceosome - viral mRNA export from host cell nucleus - positive	tm
BME26USP-76537	7	32.6	47.073	1.603	Asparaginase	met/aa
BME26USP-3631	12	30.8	69.031	1.578	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 partial - signalP detected	met/carb
BME26USP-62216	6	36.7	23.769	1.576	ribosomal protein S8 - probable fragment	ps
BME26USP-5235	4	29.6	17.055	1.536	Nucleoside diphosphate kinase	met/nuc
BME26USP-63954	5	17.1	35.977	1.535	Aldo/keto reductase family	uc
BME26USP-60833	12	69.8	23.326	1.521	Rho GDP-dissociation inhibitor	st
BME26USP-64388	13	46	29.941	1.519	Dosage compensation complex subunit MLE	tm
BME26USP-77308	2	12.2	21.646	1.511	60S ribosomal protein L11	ps
BME26USP-SigP-7998	6	51.6	16.944	0.677	serum amyloid A 1 - high-density lipoprotein particle - cholesterol metabolic process - acute-phase response - extracellular space - extracellular - signalP detected	met/lipd
BME26USP-SigP-4632	3	46.1	11.208	0.656	hypothetical secreted protein precursor	s/uk
BME26USP-76269	6	49.6	29.1	0.645	glutamate receptor ionotropic n-methyl d-aspartate-associated protein partial - probable fragment	st
BME26USP-48921	30	61.3	80.698	0.640	transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 - signalP detected	st/secreted
BME26USP-65892	10	41.3	45.074	0.603	Serpin - signalP detected	imm/secreted

BME26USP-66219	9	34.3	58.653	0.590	alkaline phosphatase protein partial - signalP detected	st/secreted
BME26USP-70602	14	46.4	40.956	0.590	Trypsin - probable fragment - signalP detected	met/aa/secreted
BME26USP-71689	11	56.6	28.16	0.584	Matricellular protein Osteonectin/SPARC/BM-40	extmat
BME26USP-62027	5	57.1	19.2	0.583	secreted glycine-rich protein - signalP detected	s/
BME26USP-67745	7	52.9	22.429	0.580	hypothetical secreted protein 790 - signalP detected	s/
BME26USP-77942	46	45.3	166.75	0.550	alpha-macroglobulin Ixodes scapularis - probable fragment - signalP detected	imm
BME26USP-SigP-63089	9	71.2	15.452	0.533	Conserved secreted protein precursor - signalP detected	s/ucs
BME26USP-76952	6	38.5	20.839	0.531	Hemolectin - hemolymph coagulation - chitin binding - cell adhesion - chitin metabolic process - wound healing - melanization defense response	s/
BME26USP-60901	3	42.3	10.138	0.518	carboxypeptidase inhibitor precursor - signalP detected	met/aa
BME26USP-68276	3	10	42.235	0.514	innexin inx2-like protein	extmat
BME26USP-SigP-78526	6	41.7	23.786	0.476	hypothetical secreted protein 790 - signalP detected	s/
BME26USP-71474	7	48.5	17.523	0.453	Inducible metalloproteinase Ixodes scapularis - signalP detected	s/protease
BME26USP-SigP-72186	8	27.4	34.015	0.439	secreted peptide precursor partial - signalP detected	s/
BME26USP-SigP-3602	8	25.6	46.856	0.434	pancreatic lipase-like enzyme partial - signalP detected	s/met/lipd
BME26USP-5463	8	43.6	26.171	0.417	secreted protein	s/
BME26USP-58773	11	38.5	45.076	0.413	Serpin - signalP detected	imm/secreted
BME26USP-73657	8	24.7	60.023	0.405	Glycolate oxidase - probable fragment - signalP detected	met/energy
BME26USP-4445	30	36.7	136.23	0.357	Nidogen - probable fragment - signalP detected	extmat
BME26USP-146	10	17.4	105.45	0.355	low-density lipoprotein receptor-related protein 1b - probable fragment	st

Apenas as proteínas com  $p\text{-value} < 0,05$  e  $FDR < 5\%$  estão apresentadas, com abundância relativa (*Foldchange*) entre  $\geq 1,5$  (vermelho) e  $\leq 0,67$  (verde). **cs:** citoesquelético; **detox/ox:** desintoxicação/oxidação; **detox:** desintoxicação; **extmat:** matriz extracelular; **imm:** imunidade; **met/aa:** metabolismo de aa; **met/carb:** metabolismo de carboidrato; **met/energia:** metabolismo de energia; **met/int:** metabolismo intermediário; **met/lipd:** metabolismo lipídico; **met/nuc:** metabolismo de nucleotídeos; **ne:** exportação nuclear; **nr:** regulação nuclear; **pe:** exportação de proteína; **pm:** modificação de proteína; **prot:** maquinaria de proteossoma; **ps:** síntese de proteína; **s/:** secretadas; **s/protease:** proteases; **s/protinh:** inibidor de proteases; **st/apoptose:** apoptose e transdução de sinal; **st:** transdução de sinal; **te:** elementos de transposição; **tf:** fator de transcrição; **tm:** maquinaria de transcrição; **tr:** canais e transportadores; **uc:** desconhecida conservada; **uk:** desconhecida.

**Tabela suplementar 5.** Proteínas exclusivamente identificadas em células BME26 não infectadas (controle) no tempo de 48 h.

ID	Peptides	Sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	Name	Class
BME26USP-65597	2	5.5	43.001	39s ribosomal protein l39	ps
BME26USP-36470	3	39	11.182	abc transporter c family member	tr
BME26USP-58939	3	8.3	61.881	Acetylcholinesterase/Butyrylcholinesterase - signalP detected	st/secreted
BME26USP-3889	1	22.6	73.431	acinus induces apoptotic chromatin condensation partial - probable fragment	st/apoptosis
BME26USP-72915	3	11.9	28.078	Adenylate kinase	met/nuc
BME26USP-3901	2	4.6	70.49	Cholesterol transport protein (Niemann-Pick C disease protein) - probable fragment	met/lipid
BME26USP-70667	3	8.9	59.5	Clathrin coat dissociation kinase GAK/PTEN/Auxilin - probable fragment	st
BME26USP-65313	2	5.5	47.835	Conserved secreted protein precursor - signalP detected	s/ucs
BME26USP-58921	3	5	98.09	DNA replication licensing factor MCM5 component - probable fragment	nr
BME26USP-69073	2	13	29.75	dolichyl-phosphate mannosyltransferase partial	met/carb
BME26USP-799	2	5.7	77.233	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1 partial - probable fragment	s/
BME26USP-63504	2	7.1	51.465	eukaryotic translation initiation factor 5-like isoform 1	ps
BME26USP-4284	2	10.5	32.755	Glycolate oxidase - signalP detected	met/energy
BME26USP-70724	2	10.4	46.11	golgi integral membrane protein 4	pe
BME26USP-4499	4	16.9	45.858	GTPase Rab1/YPT1 small G protein superfamily	st
BME26USP-4088	2	3	123.65	Holocytochrome c synthase/heme-lyase	met/energy
BME26USP-65342	3	11.4	44.74	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	met/aa
BME26USP-60967	1	16.6	17.653	late endosomal/lysosomal adaptor mapk and mtor activator 1	pm/protease
BME26USP-62689	5	18.4	37.549	Lectin VIP36 involved in the transport of glyco carrying high mannose-type glycans	pe
BME26USP-76871	2	1.1	214.84	microtubule-associated protein futsch partial - probable fragment - 74 NetOglyc sites	cs
BME26USP-64825	2	12.7	23.874	miple - heparin binding - extracellular region - growth factor - biological_process - signalP detected	st/secreted
BME26USP-58525	2	20.8	14.825	mitochondrial electron transport nadh to ubiquinone	met/energy

BME26USP-48837	4	24.7	34.126	Mitochondrial fatty acid anion carrier protein/Uncoupling protein	met/energy
BME26USP-60568	3	16.3	37.265	mRNA export protein (contains WD40 repeats)	tm
BME26USP-62502	3	25.6	13.262	NADH dehydrogenase ubiquinone 1 alpha subcomplex subunit 5 - respiratory electron transport chain - oxidoreductase	met/energy
BME26USP-76244	3	8.4	45.848	P2X receptor	st
BME26USP-58858	2	9.5	44.875	Pentatricopeptide repeat-containing protein 2	uc
BME26USP-62986	4	6.5	124.46	Protein containing adaptin N-terminal region - probable fragment	ps
BME26USP-26191	3	7.2	67.04	protein tyrosine kinase - signalP detected	st/secreted
BME26USP-74793	3	5.8	107.39	Protein tyrosine phosphatase Corkscrew - probable fragment	st
BME26USP-78002	4	29.5	22.821	Ras-like protein A - R3/R4 cell fate commitment - regulation of Notch signaling pathway - negative regulation of innate immune response - defense	pe
BME26USP-4752	6	45.8	20.906	Rho	st
BME26USP-2935	2	11.1	23.502	salivary secreted peptide	s/
BME26USP-65272	3	32.7	18.47	SCF ubiquitin ligase Skp1 component	prot
BME26USP-76328	3	15.6	39.461	serine hydrolase-like 2 - cytoplasmic membrane-bounded vesicle - mitochondrion - probable fragment - signalP detected	pe
BME26USP-62693	2	10	41.593	Serine/threonine protein phosphatase - probable fragment	st
BME26USP-58935	2	5	69.092	Sodium-neurotransmitter symporter	st
BME26USP-73738	3	13.2	30.749	tetraspanin family integral membrane protein partial - Membrane anchor detected	st
BME26USP-61870	2	14.6	17.518	translocase of outer mitochondrial membrane complex subunit tom20	pe
BME26USP-SigP-76633	3	6.7	110.95	tyrosine kinase eph ephrin receptor family - signalP detected	st/secreted
BME26USP-70151	2	7.3	55.565	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase V1 sector subunit H	tr

**cs:** citoesquelético; **detox/ox:** desintoxicação/oxidação; **detox:** desintoxicação; **extmat:** matriz extracelular; **imm:** imunidade; **met/aa:** metabolismo de aa; **met/carb:** metabolismo de carboidrato; **met/energia:** metabolismo de energia; **met/int:** metabolismo intermediário; **met/lipd:** metabolismo lipídico; **met/nuc:** metabolismo de nucleotídeos; **ne:** exportação nuclear; **nr:** regulação nuclear; **pe:** exportação de proteína; **pm:** modificação de proteína; **prot:** maquinaria de proteossoma; **ps:** síntese de proteína; **s/:** secretadas; **s/protease:** proteases; **s/protinh:** inibidor de proteases; **st/apoptose:** apoptose e transdução de sinal; **st:** transdução de sinal; **te:** elementos de transposição; **tf:** fator de transcrição; **tm:** maquinaria de transcrição; **tr:** canais e transportadores; **uc:** desconhecida conservada; **uk:** desconhecida.

**Tabela suplementar 6.** Proteínas exclusivamente identificadas em células BME26 infectadas por *R. rickettsii* no tempo de 48 h.

ID	Peptides	Sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	Name	Class
BME26USP-15350	3	17.4	23.782	60s ribosomal protein l23 partial - probable fragment	ps
BME26USP-22897	2	5.7	77.809	GMP synthase	met/nuc
BME26USP-23231	4	5.7	134.35	Damage-specific DNA binding complex subunit DDB1	nr
BME26USP-25718	2	20.8	16.773	cell adhesion molecule binding protein	extmat
BME26USP-26121	1	6.2	42.049	polyadenylate binding protein-interacting protein 1 - positive regulation of translation - translation activator - regulation of translation - - 18 NetOglyc sites	ps
BME26USP-26803	4	14.3	49.473	eukaryotic release factor 1 - smoothened signaling pathway - translation release factor	pe
BME26USP-26876	4	17.6	34.751	Bisphosphate 3'-nucleotidase BPNT1/Inositol polyphosphate 1-phosphatase	met/nuc
BME26USP-2996	8	8.6	205.02	microtubule-associated protein partial - probable fragment	cs
BME26USP-3635	1	3.9	34.774	alternative splicing factor asf/sf2 - 14 NetOglyc sites	tm
BME26USP-3827	3	31.3	25.189	Mucin-1 - negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator - positive regulation of - 22 NetOglyc sites	st/apoptosis
BME26USP-395	2	1.9	165.7	hypothetical protein	uc
BME26USP-4209	2	12.1	30.511	translation initiation factor 3 subunit f eif-3f	ps
BME26USP-42758	2	19.6	12.394	Vinculin - neuron projection morphogenesis - phagocytosis - actin cytoskeleton - structural molecule - actin binding - cytoskeletal anchoring at - probable fragment	cs
BME26USP-4311	3	9.8	45.807	adp-ribosylglycohydrolase posttranslational modification partial	ps
BME26USP-4453	2	9.7	38.476	activator of 90 kda heat shock protein atpase log 1	pm
BME26USP-4772	2	6.4	60.031	aspartyl-tRNA synthetase - ligase - translation - aspartyl-tRNA aminoacylation - nucleic acid binding - aspartate-tRNA ligase - tRNA aminoacylation	ps
BME26USP-48671	3	10.9	34.916	Steroid reductase required for elongation of the very long chain fatty acids	met/lipd
BME26USP-48926	2	7.2	53.461	Serine/threonine protein kinase Chk2 - probable fragment	nr
BME26USP-4899	4	33.6	25.959	20S proteasome regulatory subunit beta type PSMB1/PRE7	prot
BME26USP-4993	3	14.9	56.546	Histone deacetylase complex catalytic component RPD3	nr
BME26USP-5131	1	4.6	62.53	starvin - lateral inhibition - protein lipidation - Z disc - serine-type endopeptidase - chaperone binding - proteolysis - 22 NetOglyc sites	pm/protease
BME26USP-5135	4	14.5	40.847	Tropomodulin and leiomodulin	cs
BME26USP-5168	2	3.9	65.55	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like mitochondrial	pm/protease

BME26USP-58578	2	16	21.686	Predicted flavoprotein	uc
BME26USP-58701	2	11.7	39.547	Prohibitins and stomatins of the PID superfamily	met/energy
BME26USP-58802	2	6.1	74.511	tick transposon - probable fragment	te
BME26USP-58949	3	5	106.82	5'-phosphoribosylglycinamide formyltransferase - probable fragment	met/carb
BME26USP-60682	3	10.3	54.929	Formyltetrahydrofolate dehydrogenase - probable fragment	met/nuc
BME26USP-61322	2	9	35.499	secreted protein	s/
BME26USP-61966	5	7.8	119.35	Global transcriptional regulator cell division control protein	met/aa
BME26USP-62814	3	7.3	63.12	Dihydroorotase	met/nuc
BME26USP-62944	5	28.6	22.999	cargo transport protein EMP24 (p24 protein family) - signalP detected	pe
BME26USP-63104	2	4.1	48.777	Pinin - exon-exon junction complex - nucleolus - catalytic step 2 spliceosome - desmosome - nuclear speck - cell adhesion - 16 NetOglyc sites	tm
BME26USP-63404	2	8.4	37.771	Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1 - negative regulation of Rho-dependent protein serine/threonine kinase - regulation of	st
BME26USP-63496	2	12.1	40.746	immunoglobulin (CD79A) binding protein 1 - cellular_component - regulation of signal transduction	st
BME26USP-63540	3	6.3	79.843	NADH-ubiquinone oxidoreductase NDUFS1/75 kDa subunit	met/energy
BME26USP-63618	2	16.6	19.779	Vesicle coat complex COPI zeta subunit	pe
BME26USP-63775	4	28.3	34.564	26S proteasome regulatory complex subunit RPN11	prot
BME26USP-63948	5	17.3	61.64	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit d	ps
BME26USP-65015	1	2	63.115	nucleolar transcription factor 1 - probable fragment - 14 NetOglyc sites	tm
BME26USP-65063	2	4.5	62.213	Src substrate cortactin	cs
BME26USP-65250	7	12.3	89.203	ATP-dependent RNA helicase - probable fragment	tm
BME26USP-65554	5	11.3	66.098	eukaryotic translation initiation factor 3 protein partial	ps
BME26USP-66020	2	23.8	16.795	ubiquitin-protein ligase	prot
BME26USP-66072	2	25.8	24.984	Protein involved in vacuolar protein sorting	pe
BME26USP-66560	2	9.8	41.995	Cell-cycle nuclear protein contains WD-40 repeats - probable fragment	nr
BME26USP-66870	2	7.8	46.567	queuine trna-ribosyltransferase - probable fragment	met/carb
BME26USP-67027	3	11.6	41.83	Predicted GTPase-activating protein	st
BME26USP-67450	2	11.1	21.873	Vacuolar assembly/sorting protein DID2	pe
BME26USP-67568	2	4.4	107.28	26s proteasome regulatory complex atpase rpt2 partial - probable fragment	prot
BME26USP-69366	20	53.4	49.936	Alpha tubulin	cs
BME26USP-69565	4	25.5	18.887	60S ribosomal protein L21	ps
BME26USP-70736	2	9.9	45.861	Cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthases	met/aa
BME26USP-70830	2	3.8	141.08	DEAH-box RNA helicase - probable fragment	tm
BME26USP-71807	2	27	25.714	cuticular protein partial	extmat
BME26USP-72289	2	3.4	85.01	elongation factor g	ps



BME26USP-72638	2	7.1	42.851	mrna cleavage factor i subunit/cpsf subunit - probable fragment - 16 NetOglyc sites	tm
BME26USP-73619	1	22.7	85.088	Unknown product	uk
BME26USP-73913	2	12.6	29.868	cytokine induced apoptosis inhibitor 1	imm
BME26USP-74100	2	4.5	57.534	vesicle coat complex cop1 beta' subunit	pe
BME26USP-74225	2	1.9	114.15	Vacuolar sorting protein PEP3/VPS18	pe
BME26USP-74513	3	8	67.72	Glycogen phosphorylase - probable fragment	met/carb
BME26USP-749	2	8.5	39.812	secreted protein	s/
BME26USP-75601	2	4.1	55.02	IMP dehydrogenase/GMP reductase	met/nuc
BME26USP-76690	2	12.8	46.048	Cdk activating kinase (CAK)/RNA polymerase II transcription initiation/nucleotide excision repair factor TFIIH/TFIIK - probable fragment - 11 NetOglyc sites	nr
BME26USP-76910	2	7.9	25.376	Spliceosomal protein snRNP-U1A/U2B	tm
BME26USP-77172	2	32.6	10.313	heat shock factor binding protein 1	pm
BME26USP-77602	3	16.3	30.464	Fanconi anemia complementation group D2 - negative regulation of apoptotic process - probable fragment - Membrane anchor detected - 18 NetOglyc sites	st/apoptosis
BME26USP-77636	3	6.7	83.055	translation initiation factor 3 subunit b eif-3b	ps
BME26USP-77785	4	15.2	61.937	Thiamine pyrophosphate-requiring enzyme	met/aa
BME26USP-78215	3	3.3	132.79	pitrilysin metalloproteinase 1 isoform cra c - probable fragment	pm/protease
BME26USP-7910	2	10.9	34.142	Mitochondrial tricarboxylate/dicarboxylate carrier	met/energy
BME26USP-7942	2	10.2	35.243	Hypothetical protein	uc
BME26USP-SigP-64474	1	18.1	15.289	26s proteasome regulatory complex subunit rpn2/psmd1 - probable fragment - signalP detected	prot

**cs:** citoesquelético; **detox/ox:** desintoxicação/oxidação; **detox:** desintoxicação; **extmat:** matriz extracelular; **imm:** imunidade; **met/aa:** metabolismo de aa; **met/carb:** metabolismo de carboidrato; **met/energia:** metabolismo de energia; **met/int:** metabolismo intermediário; **met/lipid:** metabolismo lipídico; **met/nuc:** metabolismo de nucleotídeos; **ne:** exportação nuclear; **nr:** regulação nuclear; **pe:** exportação de proteína; **pm:** modificação de proteína; **prot:** maquinaria de proteossoma; **ps:** síntese de proteína; **s/:** secretadas; **s/protease:** proteases; **s/protinh:** inibidor de proteases; **st/apoptose:** apoptose e transdução de sinal; **st:** transdução de sinal; **te:** elementos de transposição; **tf:** fator de transcrição; **tm:** maquinaria de transcrição; **tr:** canais e transportadores; **uc:** desconhecida conservada; **uk:** desconhecida.

**Tabela suplementar 7.** Proteínas de *Rickettsia* identificadas no proteoma de células BME26 infectadas.

<b>ID Uniprot</b>	<b>Name</b>	<b>Organism</b>
A8EX77	proteína-transportadora-acil - 3-hidroxiacil- desidratase - FabZ	<i>Rickettsia canadensis (strain McKiel)</i>
A1Y197	Subunidade alfa da ATP sintase	<i>Rickettsia bellii</i>
A0A0B7J606	Proteína de resistência a multidrogas D	<i>Rickettsia monacensis</i>
A0A0F3N0E1	Proteína da família com repetições TPR	<i>Rickettsia amblyommatis str. Ac/Pa</i>
A0A0F3QJF3	Regulação bacteriana - proteína da família Fis	<i>Rickettsia bellii str. RML Mogi</i>
Q2XPR2	OmpB	<i>Rickettsia gravesii</i>
Q4UN05	Proteína não caracterizada	<i>Rickettsia felis (Rickettsia azadi)</i>
Q9RAA7	Proteína não caracterizada	<i>Rickettsia felis (Rickettsia azadi)</i>