

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

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 α -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 α -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 cells²⁶. 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.

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 riquétsias. 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*).

Ano Inic.Sintomas	Ign/Branco	Cura	Óbito por FMB	Letalidade	Óbito por outra causa	Total
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
Total	17	373	419	52,9	9	818

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 transtadial (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**].

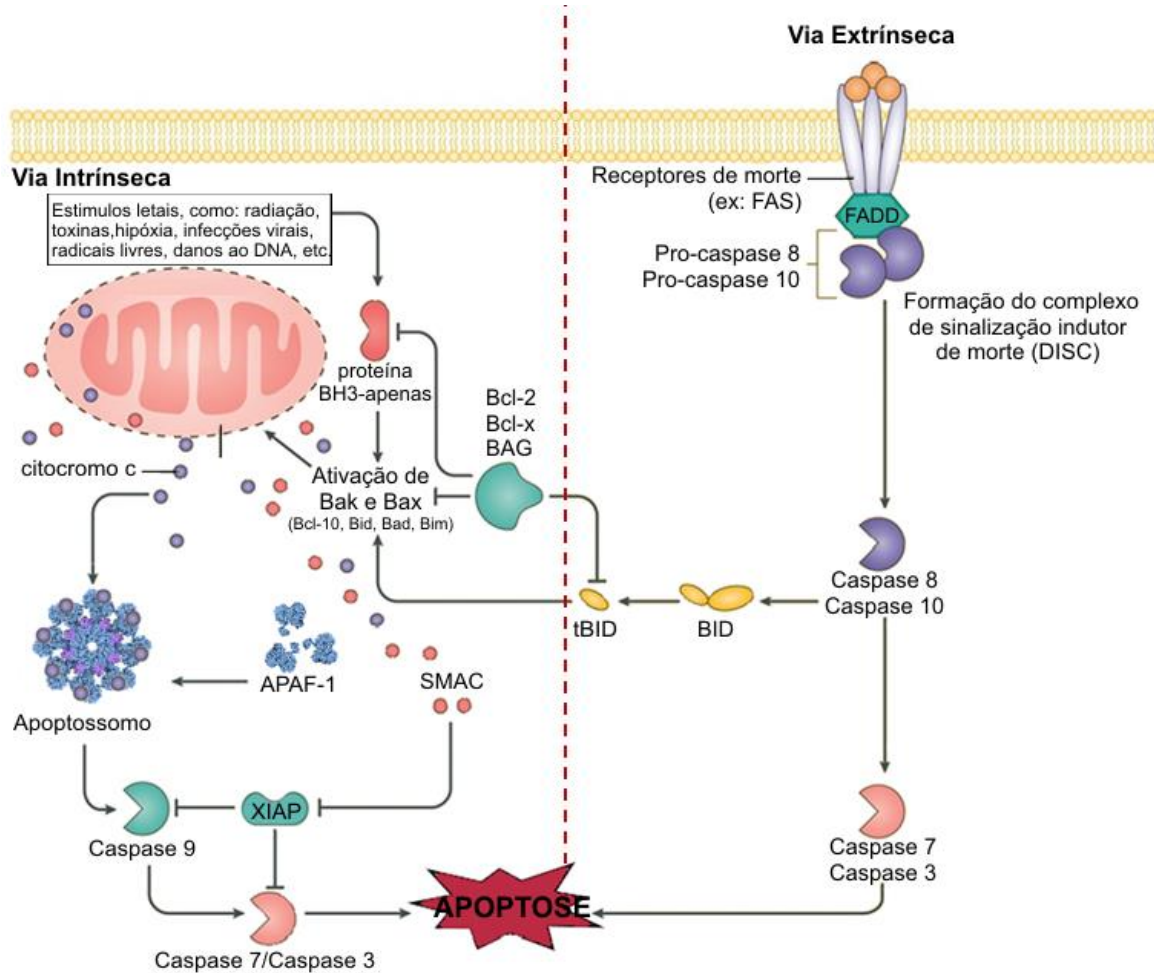


Figura 1. Via intrínseca e via extrínseca de ativação da apoptose. A apoptose pode ser ativada pela via intrínseca (ou mitocondrial), na qual as mitocôndrias desempenham um papel central, ou pela via extrínseca, na qual receptores da membrana plasmática atuam como ponto de partida no

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.

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 cIAP₂-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 cellsurvival 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 κ 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.
- 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)