



Acta Scientiae Veterinariae

ISSN: 1678-0345

ActaSciVet@ufrgs.br

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Brasil

Joazeiro, Ana Carolina; Loner Coutinho, Mariana; Martins, João Ricardo; Masuda, Aoi; Seixas, Adriana; da Silva Vaz Junior, Itabajara
Peptídeos antimicrobianos em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
Acta Scientiae Veterinariae, vol. 40, núm. 4, 2012, pp. 1-14
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289023924001>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe , Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Peptídeos antimicrobianos em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Antimicrobial Peptides in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Ana Carolina Joazeiro^{1,2}, Mariana Loner Coutinho^{1,2}, João Ricardo Martins⁴, Aoi Masuda¹, Adriana Seixas^{1,3} & Itabajara da Silva Vaz Junior^{1,2}

ABSTRACT

Background: The arthropod *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a hematophagous ectoparasite that transmits a wide number of microorganisms to their host such as bacteria *Anaplasma marginale*. Anaplasmosis is responsible for serious damages to livestock due to mortality caused in herds, decrease in milk production and weight gain and expenses with prevention and control. Is an enzootic disease in temperate, subtropical and tropical countries. In these regions, cattle contamination may occur biologically by ticks, mechanically by flies or iatrogenically. The immune system of invertebrates has multiple mechanisms, but it is simpler than the immune system of vertebrates, however the ticks have a wide variety of protection mechanisms, including production of antimicrobial peptides (AMPs) which act directly against invading pathogens. To this date, only a few AMPs have been described in *R. microplus*, and little is known about the activity of these AMPs against *A. marginale*.

Review: The tick *R. microplus* has several mechanisms to protect itself against invading microorganisms. Besides a protective cuticle and epithelia lining which are part of the first line of defense against pathogens, there are intermediate compounds of melanization, coagulation, phagocytosis, encapsulation, nodule formation, reactive oxygen species, proteins such as cystatins and additionally a vast repertoire of antimicrobial peptides (AMPs). However, the *Anaplasma* sp. have developed evolutionary mechanisms to be able to adapt and survive in this arthropod which is the main biological vector this pathogen. The AMPs can be expressed constitutively by the immune system, induced by infection, or by the recognition of surface components of microorganisms such as lipopolysaccharides (LPS) and peptidoglycan (PNG). However, through evolutionary events, the *Anaplasma marginale* lost genes encoding these components characteristic of the cell wall of Gram-negative bacteria, and thus, is likely that the major surface proteins (MSPs) are involved in its strengthening as the resistance to AMPs. Although the mechanisms of action of AMPs have not been fully elucidated, models are proposed to demonstrate how the interactions between lipid bilayer and AMP happen. More than 1,000 AMPs have been described in several groups of eukaryotes. In particular, amphibian peptides account for 592 of total AMPs representing a rich source of these molecules. Additionally, another 166 AMPs were isolated from insects. However, in *R. microplus*, few studies have described the existence of AMPs. The known *R. microplus* antimicrobial peptides are defensin and ixodidin (both isolated from hemocytes), the microplusin (isolated from female hemolymph and eggs), VTDCE (isolated gut and ovary), and other two peptides characterized as fragments of bovine hemoglobin, Hb 33-91 and Hb 98-114, (isolated from engorged female gut).

Conclusion: Since the silencing of genes encoding AMPs expressed in *R. microplus* decreases the number of *A. marginale*, it is suggested that this bacteria could adapt to support the tick immune defense mechanisms generating a symbiotic relationship, a evidence that the expression of AMPs can be manipulated by the pathogen to assist in its multiplication by a mechanism not yet defined, thus the *Anaplasma* sp. and the tick vector can live together allowing the bacteria transmission by the host. More studies about antimicrobial peptides expressed in *R. microplus* against invading microorganisms are necessary in order to improve the comprehension of its immune system and its competence for bovine anaplasmosis as a vector.

Keywords: antimicrobial peptides, *Rhipicephalus microplus*, *Anaplasma marginale*, bovine anaplasmosis.

Descriptores: peptídeos antimicrobianos, *Rhipicephalus microplus*, *Anaplasma marginale*, anaplasmoses bovina.

Received: February 2012

www.ufrgs.br/actavet

Accepted: June 2012

¹Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (CBiot), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. ³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), RS, Brazil.

⁴Instituto de Pesquisas Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS, Brazil. CORRESPONDENCE: I.S. Vaz Júnior [itabajara.vaz@ufrgs.br] FAX : +55 (51) 3308-7309]. Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, prédio 43421, Campus do Vale, UFRGS. Av. Bento Gonçalves n. 9500. CEP 9150-970 Porto Alegre, Brazil.

I. INTRODUÇÃO

1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
2. Anaplasmosse bovina

II. SISTEMA IMUNE DOS INVERTEBRADOS

1. Peptídeos Antimicrobianos

III. TRATAMENTO

1. Imunização e Terapia Antimicrobiana
2. Resistência

IV. CONCLUSÃO

V. REFERÊNCIAS

I. INTRODUÇÃO

1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos obrigatórios de vertebrados incluindo anfíbios, répteis, aves e mamíferos [27]. São classificados dentro da subordem Ixodidae, ordem Parasitiformes, com duas grandes famílias que incluem espécies com mais de 140 milhões de anos: Argasidae (carrapatos moles) e Ixodidae (carrapatos duros). Outra família, Nuttalliellidae, inclui apenas uma espécie de carrapato, a qual foi descrita em 1931 por Bedford [5]: *Nuttalliella namaqua* [55].

As larvas alimentadas dos carrapatos Ixodidae dioxenos (dois hospedeiros) e trioxenos (três hospedeiros) permanecem presas no hospedeiro e realizam apenas uma alimentação após a eclosão, por um período que dura até 21 dias, enquanto os carrapatos Argasidae alimentam-se por menos de uma hora e por múltiplas vezes [27]. A fase parasitária dos carrapatos Ixodidae monoxenos (um único hospedeiro) dura em média 21 dias e estes se alimentam preferencialmente de plasma. Apenas em momentos que precedem o rápido ingurgitamento das ninfas e das fêmeas é que o sangue torna-se o principal constituinte alimentar [7].

O carrapato Ixodidae *R. microplus* é uma espécie de um único hospedeiro que parasita preferencialmente os bovinos, sendo originário da Ásia, e encontrando-se adaptado às condições de clima tropical e neotropical, onde encontra condições favoráveis à sua sobrevivência [67]. Sua distribuição no mundo inclui os grandes rebanhos comerciais da América, África, Ásia e Oceania, entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul [30].

A fase parasitária do *R. microplus* inicia-se quando a larva se fixa no bovino. Após a eclosão, em

um período de 4-21 dias, as larvas com suas cutículas fortalecidas passam à condição de larvas infestantes e, após realizarem a fixação no bovino, passam a ser denominadas de larvas parasitárias. Durante a alimentação, as larvas parasitárias passam por alterações morfológicas e fisiológicas, mudando para os estágios de ninfa em um período de seis a oito dias. Estas continuam o processo de desenvolvimento e, num período entre 12 e 14 dias, atingem a fase seguinte com diferenciação entre os sexos. No caso dos machos, a transformação de metaninha para neandro (macho adulto jovem) dura em média 14 dias e para gonandro (macho adulto apto para cópula) mais dois dias. Com relação às fêmeas, a transformação de metaninha para neógena (fêmea jovem) ocorre em torno do 17º dia após a infestação, passando à partenógena (fêmea semi-ingurgitada) em três dias e à teleógena (fêmea ingurgitada) em dois dias. O início da queda das teleóginas ocorre em média entre o 22º e 23º dia após a infestação [29].

Durante a hematofagia, o aparato bucal entra em contato com a pele do hospedeiro, perfurando-a, fixando-se e injetando, através da saliva, componentes como anticoagulantes, agentes antiplaquetários, vasodilatadores, anti-inflamatórios e imunomodulatórios [69], substâncias que auxiliam na manutenção de um fluxo sanguíneo ideal para sua alimentação, assim como na evasão da resposta imune gerada pelo hospedeiro.

O *R. microplus* é vetor de diversos patógenos [33, 81], e em alguns casos, é sugerido que esses agentes tenham co-evoluído com os carrapatos apresentando relações ecológicas por vezes positivas [82]. Por exemplo, a co-evolução de *A. marginale* com o *Dermacentor* spp. e a relação de simbiose facultativa entre *Anaplasma phagocytophilum* e o *Ixodes scapularis*. No caso da *A. marginale*, devido ao fato de existir algumas cepas que não são transmitidas por *Dermacentor* spp. (Flórida, Illinois e Califórnia), é sugerido que existam fenótipos de transmissão conservados entre as cepas de *A. marginale* e diferenças entre as espécies de carrapatos, a fim de uma eficiente interação em nível de adesão, sobrevivência e replicação do parasita [90]. No caso do *I. scapularis*, o microrganismo contribui significativamente com a atividade e sobrevivência do carrapato, pois sua interação favorece a tolerância ao frio [28].

O carrapato *R. microplus* transmite aos bovinos os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia*

bigemina, agentes da babesiose bovina [9], porém é o principal vetor no Brasil da bactéria *Anaplasma marginale*, agente da anaplasmosse bovina, doença que acomete consideráveis perdas econômicas à pecuária além dos prejuízos causados pelo próprio parasitismo do carrapato [46, 77]

2. Anaplasmosse bovina

Bactérias do gênero *Anaplasma* pertencentes à família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales [20], são os agentes causadores da anaplasmosse, um dos principais fatores limitantes para o melhoramento da produtividade bovina em áreas tropicais e subtropicais do mundo [46]. Na bovinocultura são estimadas perdas de mais de 500 milhões de dólares por ano, além do alto índice de morbidade e mortalidade decorrentes da anaplasmosse bovina [31].

Anaplasmataceae é uma família de bactérias intracelular obrigatória que se replica dentro de vacúolos na célula hospedeira eucariota. A identificação desse agente pode ser realizada através do método de esfregaço sanguíneo onde eritrócitos infectados com *A. marginale*, corados por corantes hematológicos convencionais (Giemsa, Wright, May-Grunwald) ou corantes rápidos comerciais (Instant Prove e Panótico Rápido LB), podem ser visualizados sob o microscópio óptico como formas arredondadas próximas a membrana dos eritrócitos infectados [56].

No carrapato, a *Anaplasma* sp. desenvolve-se no intestino, e via hemolinfa podem invadir outros órgãos do carrapato como ovário, túbulos de Malpighi, células musculares e glândula salivar [45], e em bovinos desenvolvem-se dentro de eritrócitos. O desenvolvimento do microrganismo nos tecidos infectados ocorre em vacúolos ligados à membrana ou corpúsculos iniciais, denominadas de formas vegetativas ou reticuladas, formadas devido a uma invaginação da membrana eritrocitária, na qual a bactéria se multiplica por fissão binária até que sejam formadas grandes colônias contendo centenas de microrganismos. Estes se transformam na forma densa, uma forma mais arredondada e com distribuição mais uniforme dos ribossomos em sua superfície, configurando-se na forma infectante, a qual então deixa a hemácia sem rompê-la para poder invadir outras células do hospedeiro [46]. Devido à fagocitose dos eritrócitos infectados pelas células retículo-endoteliais, ocorre uma diminuição leve ou acentuada do número de eritrócitos e icterícia, uma

das principais causas da morte de bovinos. A fase aguda é caracterizada por uma elevada parasitemia, a qual pode atingir um nível maior que 70 % de eritrócitos infectados, cada um contendo de 4-8 bactérias dentro do vacúolo ligado a membrana eritrocítica. Esta fase pode apresentar um quadro clínico com febre, letargia, aborto, inapetência e morte [44, 45]. Bovinos que sobrevivem à fase aguda da doença tornam-se persistentemente infectados, apresentam nível de parasitemia menor que $10^{7.2}$ eritrócitos infectados por mL de sangue os quais são indetectáveis microscopicamente, e dessa forma, bovinos persistentemente infectados são epidemiologicamente importantes na disseminação da doença [44].

Os métodos mais comuns de transmissão de *Anaplasma* sp. incluem as formas biológica, mecânica e iatrogênica. A forma biológica ocorre através de artrópodes hematófagos, onde os carrapatos atuam como principais vetores. O microrganismo pode se multiplicar no intestino do carrapato [1] e apresentar transmissão transovariana além de que os carrapatos machos monoxenos, por sua mobilidade e longevidade, servem como reservatórios da doença, e são considerados importantes vetores epidemiologicamente da anaplasmosse bovina. Em carrapatos de múltiplos hospedeiros, a transmissão interestadial pode ocorrer, sendo que também a forma mecânica, via picada de mosquitos e moscas tais como as moscas dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) e os tabanídeos (*Tabanus* sp.) [35], adquire importância. Cerca de 20 espécies de carrapatos em todo o mundo foram descritos como transmissores biológicos dos agentes causadores de anaplasmosse [47]. Durante os três estádios de vida parasitária, o carrapato pode infectar-se e transmitir *Anaplasma* sp. para o bovino. A transmissão pode ocorrer de estádio para estádio, quando o carrapato se infecta em um estádio e transmite para o estádio seguinte (transestadial ou interestadial) [1], ou dentro do mesmo estádio, entre larvas, ninfas e adultos, onde o macho pode infectar-se em um bovino portador e transmitir para outro bovino sensível, sendo considerada uma transmissão intraestadial [75]. A transmissão mecânica também pode ocorrer quando instrumentos contaminados com sangue de animais infectados com a bactéria entram em contato com o sangue de bovinos susceptíveis, nos quais os meios veiculadores são agulhas, serra chifres, pinça de nariz e instrumentos de tatuagem ou castração. E no caso, quando não se

observa os cuidados de lavagem e esterilização dos instrumentos de cirurgia no intervalo de um animal e outro, caracteriza a forma iatrogênica [48]. Entretanto, a existência de uma transmissão transovariana é bastante controversa e ainda não foi claramente demonstrada em carapatos infectados com *A. marginale* [85].

Os carapatos não conseguem gerar uma resposta imune celular eficiente contra a *Anaplasma marginale* devido à inexistência de componentes tais como peptideoglicano (PGN) e lipopolissacarídeos (LPS) na parede celular dessa espécie [52]. Dessa forma, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) expressos em *R. microplus*, não agem contra essa bactéria a qual consegue sobreviver e ser transmitida pelo carapato para bovinos susceptíveis. Porém, estudos mostraram que na presença da *Anaplasma* sp., há um aumento nos níveis de expressão de defensina e microplusina, dois PAMs que serão descritos a seguir.

II. SISTEMA IMUNE DOS INVERTEBRADOS

O sistema imune dos invertebrados possui múltiplos mecanismos, porém mais simples que o sistema imune dos vertebrados. O fenômeno “priming immune” ou memória imunológica inata em invertebrados, proposto por Rodrigues *et al.* [71], muda o dogma de que os invertebrados são incapazes de desenvolver uma resposta imune adaptativa. A memória imunológica inata é definida como uma mudança funcional, devido à diferenciação dos hemócitos em decorrência do aumento dos granulócitos circulantes na hemolinfa. Caracteriza-se por ser uma imunidade de longo prazo a fim de estabelecer uma resposta mais eficaz em um reencontro com o microrganismo ou microrganismos semelhantes. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para entender as diferenças e semelhanças entre a resposta imune adaptativa em vertebrados e a memória imune inata em invertebrados [71].

A existência de uma cutícula protetora e epitélios de revestimento nos invertebrados fazem parte das primeiras linhas de defesa contra os patógenos. Nos estudos sobre interação patógeno-hospedeiro, observa-se a existência de compostos intermediários de melanização, coagulação, fagocitose, encapsulação, formação de nódulos e das espécies reativas de oxigênio (ROS) [65]. Também, as cistatinas, clássicos inibidores de cisteíno protease [24] e as lectinas ou hemaglutininas [32] são as proteínas mais estudadas em *R. microplus* [86]. Somando-se ainda, um vasto

repertório de peptídeos antimicrobianos (PAMs) que são importantes na resposta imune inata de diversos animais, insetos e plantas [39, 57, 86]. Dessa forma, os PAMs são considerados como componentes limitantes da infecção, multiplicação e transmissão de patógenos, dificultando a viabilidade dos microrganismos, o que acaba por favorecer a sobrevivência do carapato infectado. Como os carapatos possuem a habilidade em eliminar rapidamente os organismos não infectantes, ou seja, consegue eliminar rapidamente os organismos que ele mesmo não transmite, assim como demonstrado por La Fuente e colaboradores (2001), no qual o isolado da Flórida de *A. marginale* não foi transmitido pelo carapato *D. variabilis*, enquanto que o isolado da Oklahoma de *A. marginale* foi efetivamente transmitido. Neste estudo, os carapatos foram alimentados durante sete dias em bovinos infectados experimentalmente com os respectivos isolados, e quatro dias após a retirada dos carapatos desses bovinos, não foi encontrado o DNA por PCR quantitativo apenas do isolado da Flórida de *A. marginale* em células intestinais e glândulas salivares, as quais são as primeiras e as últimas células do carapato respectivamente a serem infectadas para que ocorra a transmissão a bovinos susceptíveis [18]. Contudo, é sugerido que o carapato elimina rapidamente os isolados de *A. marginale* que não conseguem se aderir, colonizar e infectar as células intestinais, de modo que os isolados de *A. marginale*, transmissíveis por carapatos (Oklahoma, Sta. Maries, Virgínia), diminuem os níveis de expressão dos PAMs para conseguir estabelecer a infecção no vetor [18, 47].

Os PAMs podem ser expressos constitutivamente pelo sistema imune, induzidos por uma infecção, ou mesmo pelo reconhecimento de componentes da superfície dos microrganismos como os LPS e PGN [36]. Estímulos como LPS e PGN, gerados pelas bactérias Gram-negativas, regulam a via de sinalização intracelular denominada Imd, conforme demonstrado em *Drosophila melanogaster* [36], induzindo a expressão dos PAMs. Entretanto, é característico da família Anaplasmataceae a ausência de uma parede celular tradicional devida à perda de diversos genes para a biossíntese de LPS e PGN, os quais conferem resistência e forma à bactéria [52], porém essas bactérias não parecem ser particularmente frágeis [12] e é provável que as proteínas de superfície principal (MSPs) participem do seu fortalecimento [91]. A perda dos genes para a biossíntese do lipídeo A pare-

ce ter sido um evento crítico durante a evolução dos ancestrais da família Anaplasmataceae, com alguns descendentes tornando-se bactérias intracelulares obrigatórias dos macrófagos e neutrófilos (células de defesa primária do hospedeiro) as quais expressam os receptores Toll-like que ligam-se aos LPS e PNG [52]. Dessa forma o carapato não gera uma resposta contra a *Anaplasma* sp., e assim a bactéria consegue persistir no carapato e ser transmitida para novos bovinos [65]. Em bovinos, como a *A. marginale* é parásita intracelular obrigatório de eritrócitos maduros, estes não apresentam em sua superfície os抗ígenos da classe I associados ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC I) e estrutura de processamento de抗ígeno assim, não é gerada uma resposta imune celular competente para a eliminação da *Anaplasma* sp., que permanece nos bovinos os quais servem como um reservatório infeccioso da doença [54].

Os PAMs fazem parte da resposta imune inata dos artrópodes, são armazenados em grânulos no citoplasma dos hemócitos e liberados na hemolinfa de uma maneira rápida e efetiva em decorrência da invasão por microrganismos [68]. Vários peptídeos antimicrobianos são estudados em *R. microplus*: defensina [62], microplusina [25], ixodidina [24], VTDCE [64] e os fragmentos antimicrobianos de hemoglobina bovina, como substâncias mediadoras da resposta imune deste artrópode contra patógenos invasores [26, 86].

1. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

A grande maioria dos PAMs isolados até o momento é provenientes de insetos [95] e uma grande parte de aracnídeos [79]. Foram encontrados mais de 1.180 peptídeos com atividade antibacteriana, dentre estes, 206 com atividade apenas contra bactérias Gram-positivas e 108 com atividade apenas contra bactérias Gram-negativas e mais dois PAMs contra microrganismos intracelulares obrigatórios. Um PAM com atividade contra protozoário intracelular obrigatório isolado de *Haemaphisalis longicornis* [86, 87], e outro PAM com atividade contra riquetsia intracelular obrigatória isolado de *Dermacentor variabilis* [14].

A classificação dos PAMs é baseada em seu organismo de origem, segundo um clássico sistema proposto por Whittaker [91], com apêndices de palavras-chave contendo os cinco reinos: Procariotos (Bacteria, Archaea e Eukarya), Protistas (Protozoa e Algae), Fungos, Plantas e Animais; enquanto peptídeos humanos são classificados em um grupo

independente. O sistema de classificação dos PAMs é um sistema que possibilita caracterizar os peptídeos segundo o seu tamanho, estrutura, propriedade e atividade antimicrobiana, assim como agrupar e calcular o número de peptídeos diante à grande biodiversidade existente, da mesma forma que permitir sua restrição espécie-específica [90].

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) geralmente possuem de 12 a 50 aminoácidos, 88,6 % são moléculas catiônicas por serem ricos em resíduos de lisina, arginina e histidina, que são resíduos básicos de caráter anfipático quando o pH é menor ou igual a 7 [34].

Os peptídeos catiônicos possuem regiões conservadas e são altamente flexíveis, podendo adaptar-se dependendo da natureza iônica da membrana do microrganismo encontrado. A interação do peptídeo com a membrana celular depende basicamente da alta concentração de cargas negativas encontrada nos lipídeos da parede da célula procariota, enquanto na célula eucariota são encontradas grandes quantidades de lipídeos neutros como no caso do colesterol [57]. As cecropinas foram os primeiros peptídeos antimicrobianos isolados de insetos, a partir da hemolinfa da traça (*Hyalophora cecropia*) [38]. É uma família de peptídeos antimicrobianos catiônicos de estrutura linear, compostos de 31 a 37 resíduos de aminoácidos desprovidos de resíduos de cisteína [37]. As cecropinas são caracterizadas por possuir ação lítica contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [59], por um mecanismo que age de forma seletiva sobre a membrana bacteriana [94]. O aumento da carga positiva do PAM é gerado por uma mudança pós-tradicional do grupo CONH₂, uma amidação na região C-terminal do peptídeo que causa aumento da atividade antimicrobiana [68, 92], entretanto como demonstrado com as cecropinas, o aumento exacerbado pode causar diminuição da atividade. Essa diminuição da atividade antimicrobiana pode ser devida, em parte, as fortes interações do peptídeo com as cabeças polares dos fosfolipídeos, evitando assim a translocação desse peptídeo para o interior da célula [3, 14].

Apesar dos peptídeos antimicrobianos apresentarem uma grande diversidade estrutural é possível agrupá-los em três classes distintas conforme a estrutura secundária tridimensional: lineares, cíclicos e estendidos [40].

Os peptídeos catiônicos lineares estão presentes em várias espécies de fungos, plantas, anfíbios e mamíferos [10]. Eles adotam uma conformação preferencial em α -hélice por apresentarem resíduos de leucina, alanina, glicina e lisina. A estrutura em α -hélice é resultante apenas quando o peptídeo entra em contato com a membrana bacteriana, a qual é estabilizada pelos resíduos de cisteína presente. Nos peptídeos catiônicos cíclicos, a presença de um ou dois pares de cisteína também é importante na manutenção da estrutura [40], a qual é estabilizada por ligações dissulfeto 2-4. Assim, os resíduos de cisteína possuem atividade de manutenção e estabilidade em diferentes formas estruturais dos PAMs [96].

Os peptídeos de cadeia longa de estrutura estendida são os peptídeos que apresentam predominância de um ou dois resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária, podendo ser glicina, prolina, triptofano, arginina ou histidina. Estes são os principais componentes isolados de insetos que apresentam atividade antibacteriana e antifúngica [100]. Os peptídeos que contém resíduos de arginina também parecem apresentar atividade antiviral, estes aminoácidos estão presentes tanto na estrutura em folha- β quanto na estrutura em α -hélice e proporcionam flexibilidade à cadeia dos peptídeos [40]. Interessantemente peptídeos com estrutura em folha- β apresentam maior quantidade de resíduos de arginina do que de resíduos de lisina, enquanto a família das β -defensinas apresenta uma proporção de 1:1 entre os resíduos de arginina e lisina. Além disso, um menor número de mutações ocorre no códon que codifica o aminoácido arginina das β -defensinas em relação ao códon que codifica o aminoácido arginina das α -defensinas. Tais mutações geram o aminoácido lisina, altamente hidrofílico. Este, supostamente, é um mecanismo essencial para uma contínua atividade antibacteriana, visto que peptídeos sem modificações apresentam maior atividade antimicrobiana em relação aos peptídeos modificados [94]. Tanto a estrutura em α -hélice quanto à estrutura em folha- β presentes na região C-terminal do peptídeo, podem ser caracterizadas como sítio funcional do peptídeo, e modificações nesta região na qual contém aminoácidos hidrofílicos para aminoácidos hidrofóbicos, mostram que a atividade do peptídeo está relacionada com a característica anfipática. Acredita-se que a atividade antimicrobiana e a seletividade dos peptídeos sejam determinadas pelo modo de interação dessas

moléculas com as membranas celulares dos microrganismos, visto que essa interação é responsável por causar perturbações e acarretar na lise celular [51, 97, 98]. Este processo é muito mais rápido que a maioria dos mecanismos de ação dos antibióticos clássicos, os quais se baseiam em inibição enzimática [53]. Um bom exemplo da classe de peptídeos de cadeia longa estendida é a indolicina, um membro da família das proteínas catelicidinas, que são peptídeos isolados de grânulos citoplasmáticos de neutrófilos bovinos [73].

1.2 Peptídeos Antimicrobianos de *R. (B.) microplus*

A primeira atividade antimicrobiana descrita em carrapatos foi na espécie *D. variabilis*, e relata fatores hemolinfáticos semelhantes à lisozima, encontrados em abundância na hemolinfa após uma infecção bacteriana. Esta proteína hemolinfática, foi separada por cromatografia líquida de alta pressão e apresentou uma massa molecular de 14,5 kDa, a mesma que a lisozima humana, mostrando-se eficiente contra bactérias Gram-positivas como a *Bacillus subtilis*, e sem nenhuma atividade contra bactérias Gram-negativas [41].

Posteriormente, foi demonstrado que o PAM defensina ou varisina, como é denominado em *D. variabilis*, apresentou aumento da expressão quando o carrapato foi infectado artificialmente com a riquetsia intracelular obrigatória, *Rickettsia montanensis* [15], e em resposta aos protozoários *Babesia* spp. [87]. Entretanto, quando o gene que codifica a defensina foi silenciado por RNA de interferência houve uma diminuição no número de *A. marginale* mostrando que a expressão do PAM, que age contra outros microrganismos e não contra esta bactéria, pode ser regulada por ela, para auxiliar na sobrevivência e multiplicação dentro do vetor por um mecanismo ainda não definido [47].

No intestino de *H. longicornis*, um peptídeo estruturalmente semelhante à defensina, denominado longicina, foi identificado [88]. A atividade do peptídeo recombinante longicina, foi eficaz contra uma ampla gama de microrganismos incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Além de apresentar atividade anti-Babesia a qual foi demonstrada a partir de experimentos *in vitro*, e *in vivo* com camundongos infectados com a *Babesia microti*, mostrando diminuição significativa nos níveis de parasitemia [88].

Em *R. microplus*, os mediadores da resposta imune descritos são: defensina, microplusina, ixodina, VTDCE [64] e dois fragmentos da cadeia α da hemoglobina bovina Hb 33-61, Hb 98-114 [80].

A família da defensina foi identificada pela primeira vez em hemócitos do carapato *D. variabilis* [42], posteriormente em *Ornithodoros moubata*, por Nakajima [62, 63] e apresenta uma similaridade com a defensina de outros invertebrados [25]. A defensina também foi isolada de plantas, mamíferos e insetos, entre eles os hematófagos *Stomoxys calcitrans* [60], *Anopholes gambiae* [69] e a mosca tsé tsé *Glossina morsitans* [11].

A expressão da defensina foi demonstrada no intestino médio de *Ornithodoros moubata*, assim como sua secreção no lúmen intestinal deste parasita [61], seu armazenamento se dá em hemócitos e sua liberação ocorre na hemolinfa frente a uma infecção [8]. Contudo, os principais sítios de expressão gênica da defensina são o corpo gorduroso e os hemócitos, sendo poucos os estudos que demonstraram sua expressão em glândula salivar [73, 87]. A defensina expressa em artrópodes é caracterizada por possuir três pontes dissulfeto, além de uma estrutura comum composta de uma α-hélice e uma folha-β unidas por uma ponte de dissulfeto. Apresenta uma massa molecular de 4,2 kDa e seis resíduos de cisteína altamente conservados, que formam quatro ligações de dissulfeto responsáveis por estabilizar a estrutura tridimensional do peptídeo, e capaz de formar poros na membrana de bactérias e fungos [63]. Sua forma recombinante teve atividade contra bactérias Gram-positivas, permeabilizando a membrana bacteriana, mas não foi ativa contra bactérias Gram-negativas [61]. No entanto, experimentos posteriores realizados com as células embrionárias de *R. microplus*, BME26, mostraram uma expressão aumentada da defensina quando infectadas com *A. marginale*. Porém, quando foi realizada a análise da biblioteca dos genes diferencialmente expressos nas células BME26 infectadas ou não com *A. marginale*, foram encontradas muitas sequências similares com proteínas associadas à replicação e ao capsídeo viral de espécies da família Tymoviridae, sugerindo que este vírus, embora presente em células não infectadas com *Anaplasma* sp. apresenta aumento da transcrição em células infectadas com *A. marginale* [21].

A microplusina é expressa constitutivamente em corpo gorduroso, ovário [24] e ovos de *R. microplus* [23]. No período inicial da postura, os ovários apresentam picos de transcritos gênicos do peptídeo, e ao longo do desenvolvimento do embrião apresenta uma grande variação, atingindo um alto nível novamente ao

final da embriogênese, o que mostra que a expressão da microplusina é variável durante todo desenvolvimento embrionário [22]. A microplusina é um peptídeo antimicrobiano rico em histidina, com tamanho molecular de 10,2 kDa. Esteves *et al.* [21], mostraram a expressão aumentada da microplusina em células BME26 de *R. microplus*, em compartimentos celulares, organelas do complexo de golgi e no retículo endoplasmático induzido por diferentes estímulos microbianos inativados pelo calor como LPS. Dessa forma a microplusina apresenta efeito bacteriostático mesmo em baixas concentrações, em uma concentração mínima inibitória de 0,39 μM, contra bactérias Gram-positivas menores que 3 μm e fungos com tamanho inferior a 6 μm [22], porém sem efeito contra bactérias Gram-negativas [78]. Em altas concentrações, apresenta atividade antiparasitária. Um estudo realizado por Rodrigues [72] com injeções intratorácicas de microplusina (10 μM e 30 μM) em *Aedes aegypti* infectado com *Plasmodium gallinaceum*, resultou na redução do número de esporozoítos na glândula salivar em comparação com o grupo controle.

O principal mecanismo antibacteriano, especialmente em bactérias Gram-positivas, da microplusina é a quelação de íons de cobre, visto que é necessária a presença deste metal no metabolismo respiratório dos microrganismos [78]. Genes de peptídeos análogos a microplusina também foram clonados de ovos de outros carrapatos, *O. moubata* e *Amblyomma hebraeum* com atividade antimicrobiana contra *Serratia marcescens* [2].

Ixodidina é um peptídeo inibidor de serino proteases isolado de hemócitos de *R. microplus*, apresenta massa molecular de 7,1 kDa e dez resíduos de cisteína [24]. Este PAM possui atividade antimicrobiana confirmada apenas contra bactérias Gram-positivas menores que 0,25 μm, enquanto ainda é desconhecida sua atividade contra bactérias Gram-negativas e fungos, e se a sua função é microbicida ou microbiostática [24]. Similarmente à defensina, a ixodidina foi avaliada e demonstrou aumento de expressão em células BME26 infectadas com *A. marginale*. Porém, ao contrário da defensina, quando a análise da biblioteca dos genes diferencialmente expressos em BME26 infectadas ou não com *A. marginale* foi realizada, foram observadas muitas sequências similares com as proteínas associadas à replicação e ao capsídeo viral [21].

O Hb 33-61 é um peptídeo isolado do intestino de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, identificado

como sendo um fragmento da cadeia α da hemoglobina bovina. Possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas menores que 11 μm e fungos menores que 21 μm , é um composto microbicida permeabilizador de membranas [26]. Em 1999, seu isolamento foi publicado sugerindo sua ação na defesa do trato digestivo destes carrapatos, utilizando a hemoglobina do hospedeiro como agentes de controle microbiano no seu intestino [26]. O Hb 98-114 é outro peptídeo isolado do intestino de fêmeas *R. microplus* ingurgitadas, com atividade microbicida, que age permeabilizando membranas de diversas leveduras e fungos filamentosos, com tamanho menor que 12 μm [80]. Embora não tenha atividade contra bactéria maior que 5 μM [6].

Recentemente foi descrito que uma proteína com tamanho de 12,907 kDa denominada de cisteíno endopeptidase degradadora de vitelina (VTDCE), presente no intestino e ovário de *R. microplus*, mostrou similaridade com a sequência de aminoácidos da microplusina e independente da sua atividade enzimática, a VTDCE apresentou atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de *Staphylococcus epidermidis* na concentração de 5,5 μmol da rVTDCE [64].

Vários modelos indicam que o mecanismo de ação dos PAMs ocorre pela combinação de efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos [76]. Os peptídeos carregados positivamente são atraídos pelas membranas aniônicas das bactérias os quais se ligam e sofram mudanças conformacionais para adotar uma estrutura anfipática [3]. Entretanto, os mecanismos de permeabilização e atividade antibacteriana ainda não estão completamente elucidados e modelos são propostos para demonstrar como as interações entre bicamada lipídica e PAM acontecem [4].

Independente do mecanismo de ação, uma despolarização da membrana bacteriana, a formação de poros que provocam o extravasamento do conteúdo celular, a ativação dos processos letais como a indução de hidrolases que degradam a membrana, a desorganização da distribuição de lipídeos na membrana que resulta na perturbação do funcionamento normal da membrana, e danos a alvos intracelulares após a entrada do peptídeo na célula, resultam na lise da membrana e na morte bacteriana [98, 99].

III. IMUNIZAÇÃO

1. Imunização e Terapia Antimicrobiana

Com o intuído de proteger os bovinos contra a anaplasmosse, o tipo de vacina mais utilizada em

vários países como Austrália, África do Sul, Israel, Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil é a vacina viva de *Anaplasma centrale*. A *A. centrale* é uma cepa menos patogênica que pode causar infecção branda ao animal com um grau moderado de anemia, mas surtos com *A. centrale* são considerados eventos raros. O *A. centrale* confere imunidade parcial contra uma grande heterogeneidade de isolados de *A. marginale* [43].

Os bovinos vacinados e os que sobrevivem à fase aguda da doença permanecem infectados ao longo da vida e acabam servindo como um reservatório infeccioso para bovinos livres de infecção, de forma que a vacina de *A. centrale* não previne a infecção por *A. marginale*, mas protege contra a doença clínica e a morte [44]. Devido à ausência de uma vacina universal eficaz no controle da anaplasmosse bovina geralmente são utilizadas terapias antimicrobianas combinadas com biocontenção e biossegurança animal [29].

A tetraciclina é um dos principais compostos usados para o controle da anaplasmosse aguda [84] e quando administrada em baixas doses, previne ou reduz a doença clínica, assim como a fluoroquinolona e o dipropionato de imidocard, administrados em baixas doses, não eliminam totalmente a infecção, que persiste após o tratamento [17], de modo que a quimioesterilização mesmo quando doses elevadas de medicamentos são utilizadas, não é alcançada. Entretanto, mesmo que a administração da tetraciclina seja justificada como curativa da doença, os animais permanecem como reservatório infeccioso [17].

A absorção da tetraciclina ocorre por um processo de difusão simples [16], no qual um cátion passa através de poros da membrana externa das bactérias Gram-negativas. Sua forma protonada se difunde pelo periplasma bacteriano através de uma variação de pH [95] capturando a carga negativa da bactéria que passa a apresentar uma carga neutra. Consequentemente, a tetraciclina impede a passagem da bactéria através do citoplasma assim como impede sua síntese protéica por evitar a ligação das moléculas de aminoacil-tRNA para a subunidade 30S ribossomal. Deste modo, a tetraciclina é considerada uma droga bacteriostática, devido seu modo de ação inibitório da ligação do aminoacil-tRNA ao sítio acceptor no ribossomo 70S, além de também induzir uma notável mudança fisiológica da bactéria como visualizado em células BME26 de *R. microplus* infectadas com *A. marginale* [17].

2. Resistência

As bactérias selecionam mecanismos de resistência aos peptídeos antimicrobianos os quais impedem a fixação e a inserção do peptídeo na membrana bacteriana. As estratégias de resistência envolvem a regulação da expressão gênica, interferência na identificação do alvo (como modificação de LPS), inibição ou destruição da atividade biológica do peptídeo (como expressão de peptidases), modificações sintéticas e enzimáticas de estruturas de superfície de membrana (alterações na molécula do rRNA 23S, as quais são controladas por um lócus específico), além da produção de sistemas de efluxo dos PAMs (bombeamento para o meio exterior). As alterações na proteína de membrana externa de certa forma aumentam a resistência aos PAMs em algumas bactérias Gram-negativas, assim como a *Yersinia enterocolitica* [13].

Os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos envolvem principalmente a proteção à proteína e a inativação enzimática, através de processos direcionados por numerosos genes de resistência encontrados em bactérias comensais e patogênicas [16].

A eficiência do tratamento depende do momento em que o fármaco é administrado aos animais, Kuttler [50] verificou que no período pré-parasitário da infecção não existe sinal de eliminação da bactéria e desta forma, a *A. marginale* é resistente a tetraciclina nesta fase da infecção.

IV. CONCLUSÃO

Os PAMs são gerados para atuar em diversas atividades antimicrobianas por mecanismos ainda não

compreendidos totalmente, e como existe uma ampla variedade de PAMs acredita-se haver sinergismo entre os peptídeos durante a ação antimicrobiana.

Devido ao aparecimento de resistência aos antimicrobianos, os PAMs são alternativas importantes biotecnologicamente para o processamento de novos tratamentos microbicidas e novas armas terapêuticas. Os PAMs podem ser sintetizados a fim de criar moléculas com uma maior seletividade contra microrganismos patogênicos, ou ainda a síntese de peptídeos menores a partir de peptídeos mais complexos que podem ser facilmente sintetizados para a produção em larga escala, e da mesma forma, identificar moléculas envolvidas na resposta imune inata dos carrapatos gerando oportunidades ao desenvolvimento de vacinas para prevenção da transmissão de doenças.

A infecção por *Anaplasma marginale* reduz os níveis de expressão dos PAMs para que seja possível se estabelecer no processo infeccioso, uma evidência de que a expressão dos PAMs pode ser manipulada pelo patógeno para ajudar na multiplicação por um mecanismo ainda não definido. Contudo, em resposta a ingestão de diversos microrganismos no processo de alimentação dos *Rhipicephalus microplus*, os PAMs podem ser um fator importante no entendimento das diferenças na competência vetorial destes transmissores de doenças parasitárias.

Agradecimentos. Ao CNPq, CAPES, INCT- Entomologia Molecular, FAPERGS, FAPERJ.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERÊNCIAS

- 1 Aguirre D.H., Gaido A.B., Vinabal A.E., De Echaide S.T. & Guglielmone A.A. 1994. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. *Parasite*. 1(4): 405-407.
- 2 Arrieta M.C., Leskiw B.K. & Kaufman W.R. 2006. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraicum* (Acari:Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*. 39(3-4): 297-313.
- 3 Bechinger B. 2004. Structure and function of membrane-lytic peptides. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 23(3): 271-292.
- 4 Bechinger B. & Lohner K. 2006. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*. 1758(9): 1529-1539.
- 5 Bedford G.A.H. 1931. *Nuttalliella namaqua*, a new genus and species of tick. *Parasitology*. 23(2): 230-232.
- 6 Belmonte R., Cruz C.E., Pires J.R. & Daffre S. 2012. Purification and characterization of Hb 98-114: A novel hemoglobin-derived antimicrobial peptide from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Peptides*. [in press].

- 7** **Bennet G.F. 1974.** Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) Acarina: Ixodidae. II. Influences of temperature, humidity and light. *Acarologia*. 16: 250-257.
- 8** **Beernstsen B., James A.A. & Christensen B.M. 2000.** Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 64(1): 115-137.
- 9** **Bock R., Jackson L., Vos A. & de Jorgensen W. 2004.** Babesiosis of cattle. *Parasitology*. 129 (Suppl): 247-269.
- 10** **Boman H.G. 2003.** Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*. 254(3): 197-215.
- 11** **Boulanger N., Brun R., Ehret-Sabatier L., Kunz C. & Bulet P. 2002.** Immunopeptides in the defense reactions of *Glossina morsitans* to bacterial and *Trypanosoma brucei brucei* infections. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32(4): 369-375.
- 12** **Brayton K.A., Kappmeyer L.S., Herndon D.R., Dark M.J., Tibbals D.L., Palmer G.H., McGuire T.C. & Knowles Jr. D.P. 2005.** Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(3): 844-849.
- 13** **Brodgen K.A. 2005.** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. 3(3): 238-250.
- 14** **Bulet P., Hetru C., Dimarcq J.L. & Hoffmann D. 1999.** Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*. 23(4-5): 329-344.
- 15** **Ceraul S.M., Dreher-Lesnick S.M., Gillespie J.J., Rahman M.S. & Azad A.F. 2007.** New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. *Infection and Immunity*. 75(4): 1973-1983.
- 16** **Chopra I. & Roberts M. 2001.** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology Molecular Biology Review*. 65(2): 232-260.
- 17** **Coetzee J.F., Apley M.D. & Kocan K.M. 2006.** Comparison of the efficacy of enrofloxacin, imidocarb and oxytetracycline for clearance of persistent *Anaplasma marginale* infections. *Veterinary Therapeutics*. 7(4): 347-360.
- 18** **De la Fuente J., Garcia-Garcia J.C., Blouin E.F. & Kocan K.M. 2001.** Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *International Journal of Parasitology*. 31(14): 1705-1714.
- 19** **DeLoach J.R. & Wagner G.G. 1984.** Pharmacokinetics of tetracycline encapsulated in bovine carrier erythrocytes. *American Journal of Veterinary Research*. 45(4): 640-642.
- 20** **Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y. & Rurangirwa F.R. 2001.** Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51(6): 2145-2165.
- 21** **Esteves E. 2009.** Células embrionárias BME26: modelo para o estudo da interação *Anaplasma marginale* e o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 96f. São Paulo, SP. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós- graduação em Biologia da Relação Patógeno - Hospedeiro, Universidade de São Paulo.
- 22** **Esteves E., Fogaça A.C., Maldonado R., Silva F.D., Manso P.P., Pelajo--Machado M., Valle D. & Daffre S. 2009.** Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: cellular localization and temporal expression of microplusin and oogenesis and embryogenesis. *Development Comparative Immunology*. 33(8): 913-919.
- 23** **Esteves E., Lara F.A., Lorenzini D.M., Costa G.H.N., Fukuzawa A.H., Pressinotti L.N., Silva J.R., Ferro J.A., Kurtti T.J., Munderloh U.G. & Daffre S. 2008.** Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38(5): 568-580.
- 24** **Fogaça A.C., Almeida I.C., Eberlin M.N., Tanaka A.S., Bulet P. & Daffre S. 2006.** Ixodidin a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity serine proteinases. *Peptides*. 27(4): 667-674.
- 25** **Fogaça A.C., Lorenzini D.M., Kaku L.M., Esteves E., Bulet P. & Daffre S. 2004.** Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Development & Comparative Immunology*. 28(3): 191-200.

- 26 Fogaça A.C., Da Silva P.I.Jr., Miranda M.T.M., Bianchini A.G., Miranda A., Ribola P.E.M. & , Daffre S. 1999.** Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *The Journal of Biological Chemistry.* 274(36): 25330-25334.
- 27 Francischetti I.M., Sa-Nunes A., Mans B.J., Santos I.M. & Ribeiro J.M. 2009.** The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience.* 14: 2051-2088.
- 28 Girish N., Hameeda S., Durland F., John F.A. & Erol F. 2010.** *Anaplasma phagocytophilum* induces *Ixodes scapularis* ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. *The Journal of Clinical Investigation.* 120(9): 3179-3190.
- 29 Gonzales J.C. 1974.** O carapato do boi: vida, resistência e controle. São Paulo: Mestre Jou, 101p.
- 30 Gonzales J.C. 1975.** O controle do carapato bovino. Porto Alegre: Sulina, 104p.
- 31 Grisi L., Massard C.L., Borja G.E.M. & Pereira J.B. 2002.** Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária.* 21(125): 8-10.
- 32 Grubhoffer L., Kóvar V. & Rudenko N. 2004.** Tick lectins: structural and functional properties. *Parasitology.* 129 (Suppl): 113-125.
- 33 Guglielmone A.A., Estrada-Peña A., Keirans J.K. & , Robbins R.G. 2003.** Ticks (Acari: Ixodida) of the neotropical zoogeographic region. In: *International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases.* (Atalanta, Houten). p.173.
- 34 Hancock R.E.W. 2001.** Cationic peptides: effector in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infections Diseases.* 1(3): 156-164.
- 35 Hawkins J.A., Love J.N. & Hidalgo R.J. 1982.** Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). *American Journal of Veterinary Research.* 43(4): 732-734.
- 36 Hoffman J.A. & Reichhart J.M. 2002.** Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunology.* 3(2): 121-126.
- 37 Hultmark D., Engstrom A., Bennich H., Kapur R. & Boman H.G. 1982.** Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae*. *European Journal of Biochemistry.* 127(1): 207-217.
- 38 Hultmark D., Steiner H., Rasmussen T. & Boman H.G. 1980.** Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry.* 106(1): 7-16.
- 39 Iwanaga S. & Lee B.L. 2005.** Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 38(2): 128-150.
- 40 Jenssen H., Hamill P. & Hancock R.E. 2006.** Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 19(3): 491-511.
- 41 Johns R., Sonenshine D.E. & Hynes W.L. 1998.** Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *Journal of Medical Entomology.* 35(4): 458-464.
- 42 Johns R., Sonenshine D.E. & Hynes W.L. 2001.** Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 31(9): 857-865.
- 43 Kessler R.H., Sastre A.M. & Moreira M.A. 1991.** Experiencias con vacunas vivas atenuadas de *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma centrale* conservadas por congelación en Brasil. *Revista Cubana de Ciências Veterinárias.* 22(3): 189-196.
- 44 Kocan K.M., de la Fuente J., Blouin E.F., Coetzee J.F. & Ewing S.A. 2010.** The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology.* 167(2-4): 95-107.
- 45 Kocan K.M., de la Fuente J., Blouin E.F. & Garcia-Garcia J.C. 2004.** *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology.* 129 (Suppl): 285-300.
- 46 Kocan K.M., de la Fuente J., Guglielmone A.A. & Meléndez D. 2003.** Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews.* 16(4): 698-712.
- 47 Kocan K.M., de La Fuente J., Roman R.M., Naranjo, V., Hynes W.L. & Sonenshine, D.E. 2008.** Silencing expresion of the defensin, varisin, in male *Dermacentor variabilis* by RNA interferente results in reduced *Anaplasma marginale* infections. *Experimental & Applied Acarology.* 46(1-4): 17-28.

- 48 Kocan K.M., Yoshioka J., Sonenshine D.E., de la Fuente J., Ceraul S.M., Blouin E.F. & Almazán C. 2005.** Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *Journal of Medical Entomology*. 42(5): 864-874.
- 49 Kopacek P., Vogt R., Jindrák L., Weise C. & Safarik I. 1999.** Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 29(11): 989-997.
- 50 Kuttler K.L. 1981.** Treatment and control of anaplasmosis. An overview. In: *Proceedings of the 7 th National Anaplasmosis Conference*. (Starkville, U.S.A.). pp. 543-558.
- 51 Liang J.F. & Kim S.C. 1999.** Not only the nature of peptide but also the characteristics of cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide. *The Journal of Peptide Research*. 53(5): 518-522.
- 52 Lin M. & Rikihisa Y. 2003.** *Erlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocitophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infection and Immunity*. 71(9): 5324-5331.
- 53 Lohner K. & Prenner E. J. 1999.** Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1462(1-2): 141-156.
- 54 Madruga C.R., Araujo F.R. & Soares C.O. 2001.** Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. Campo Grande: Embraapa Gado de Corte, 360p.
- 55 Mans B.J., de Klerk D., Pienaar R. & Latif A.A. 2011.** *Nuttalliella namaqua*: A Living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks. *PLoS One*. 6(8): 23675-23685.
- 56 Marcelino I., Almeida A.M., Ventosa M., Pruneau L., Meyer D.F., Martinez D., Lefrançois T., Vachiéry N. & Coelho A.V. 2012.** Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines. *Journal of Proteomics*. 75(14): 4232- 4250.
- 57 McPhee J.B., Hancock R.E. 2005.** Function and therapeutic potential of host defence peptides. *Journal Peptide Science*. 11(11): 677-687.
- 58 Millar D.A. & Ratcliffe N.A. 1994.** Invertebrates. In: Turner R.J. (Ed). *Immunology: A comparative approach*. New York: Chichester, pp. 29-68.
- 59 Moore A.J., Beazley W.D., Bibby M.C. & Devine D.A. 1996.** Antimicrobial activity of cecropins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 37(6): 1077-1089.
- 60 Munks R.J., Hamilton J.V., Lehane S.M. & Lehane M.J. 2001.** Regulation of midgut defensin production in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Insect Molecular Biology*. 10(6): 561-571.
- 61 Nakajima Y., Saido-Sakanaka H., Taylor D. & Yamakawa M. 2003.** Up-regulated humoral immune response in the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Parasitology Research*. 91(6): 476-481.
- 62 Nakajima Y., Van der Goes Van Naters-Yasui A., Taylor D. & Yamakawa M. 2002.** Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *Insect Molecular Biology*. 11(6): 611-618.
- 63 Nakajima Y., Van Naters-Yasui A.G., Taylor D. & Yamakawa M. 2001.** Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31(8): 747-751.
- 64 Oldiges D.P., Parizi L.F., Zimmer K.R., Lorenzini D.M., Seixas A., Masuda A., da Silva Vaz Jr. I. Jr. & Termignoni C. 2012.** A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity. *International Journal for Parasitology*. 42(7): 635-645.
- 65 Palmer G.H. 2002.** The highest priority: what microbial genomes are telling us about immunity. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 85(1-2): 1-8.
- 66 Pereira L.S., Oliveira P.L., Barja-Fidalgo C. & Daffre S. 2001.** Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental Parasitology*. 99(2): 66-72.
- 67 Powell R.T. & Reid T.J. 1982.** Project tick control. *Queensland Agricultural Journal*. 108(6): 279-300.
- 68 Pukala T.L., Bowie J.H., Maselli V.M., Musgrave I.F. & Tyler M.J. 2006.** Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Natural Product Reports*. 23(3): 368-393.
- 69 Ribeiro J.M. & Francischetti I.M. 2003.** Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review Entomology*. 48: 73-88.

- 70 Richman A.M., Bulet P., Hetru C., Barillas-M., Hoffmann J.A. & Kafatos F.C. 1996.** Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*: biochemical purification of a defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. *Insect Molecular Biology*. 5(3): 203-210.
- 71 Rodrigues J., Brayner F.A., Alves L.C., Dixit R. & Barillas-M.C. 2010.** Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *Science*. 329(5997): 1353-1355.
- 72 Rodrigues D.G. 2005.** Efeitos de peptídeos antimicrobianos em esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum*. 61f. São Paulo, SP. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós- graduação em Biologia da Relação Patógeno — Hospedeiro, Universidade de São Paulo.
- 73 Rozek A., Friedrich C.L. & Hancock R.E.W. 2000.** Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*. 39(51): 15765-15774.
- 74 Rudenko N., Golovchenko M., Edwards M.J. & Grubhoffer L. 2005.** Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. *Journal of Medical Entomology*. 42(1): 36-41.
- 75 Samish M., Pipano E. & Hadani A. 1993.** Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus annulatus* ticks in cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 54(3): 411-414.
- 76 Sanderson J.M. 2005.** Peptide-lipid interactions: insights and perspectives. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 3(2): 201-212.
- 77 Seixas A., Oliveira P., Termignoni C., Logullo C., Masuda A. & da Silva Vaz Jr. I. Jr. 2012.** *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 148(1-2): 149-156.
- 78 Silva F.D., Rezende A., Rossi D.D., Esteves E., Pyszy F.H., Scheier S., Gueiros-Filho F., Barbosa C., Pires J.R. & Daffre S. 2009.** Struture and mode of action of microplusin, a copper II chelanting antimicrobial peptide from the cattle tick *Riphicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal Biology Chemical*. 284(50): 34735-34746.
- 79 Silva Jr. P.I. 2000.** Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*. São Paulo, SP. 169f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-graduação em Interação Parasito - Hospedeiro, Universidade de São Paulo.
- 80 Silva R.C.B. 2010.** Isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos derivados da digestão da hemoglobina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 85f. São Paulo, SP. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Programa de Pós- Graduação em Biologia da Interação Patógeno - Hospedeiro, Universidade de São Paulo.
- 81 Sonenshine D.E. 1991.** Biology of ticks. New York: Oxford University Press, 447p.
- 82 Sonenshine D.E. 1993.** Biology of ticks. 2nd end. New York: Oxford University Press, 465p.
- 83 Sonenshine D.E., Hynes W.L., Ceraul S.M., Mitchell R.D. & Benzine T. 2005.** Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick **Dermacentor variabilis** contribute to bacterial control. *Experimental Applied Acarology*. 36(3): 207-223.
- 84 Splitter E.J. & Miller J.G. 1953.** The apparent eradication of anaplasmosis carrier state with antibiotics. *Veterinary Medicine*. 48(12): 486-488.
- 85 Stich R.W., Kocan K.M., Palmer G.M., Ewing S.A., Hair J.A. & Barron J.S. 1989.** Transtadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *American Journal of Veterinary Research*. 50(8): 1377-1380.
- 86 Taylor DeMar. 2006.** Innate Immunity in Ticks: A review. *The Acarological Society of Japan*. 15(2): 109-127.
- 87 Tsuji N., Battsetseg B., Boldbaatar D., Miyoshi T., Xuan X., Oliver Jr. J.H.Jr. & Fujisaki K. 2007.** A babesial vector tick defensin against *Babesia* parasites. *Infection and Immunity*. 75(7): 3633-3640.
- 88 Tsuji N. & Fujisaki K. 2007.** Longicin plays a crucial role in inhibiting the transmission of *Babesia* parasites in the vector tick. *Haemaphysalis longicornis*. *Future Microbiology*. 2(6): 575-578.
- 89 Todd S.M., Sonenshine D.E. & Hynes W.L. 2007.** Tissue and life-stage distribution of a defensin gene in the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. *Medical and Veterinary Entomology*. 21(2): 141-147.
- 90 Ueti M.W., Reagan Jr. J.O.Jr., Knowles Jr. D.P.Jr., Scoles G.A., Shkap V. & Palmer G.H. 2007.** Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*. 75(6): 2959-2964.
- 91 Vidotto M.C., McGuire T.C., McElwain T.F., Palmer G.H. & Knowles Jr. D.P.Jr. 1994.** Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infections and Immunity*. 62(7): 2940-2946.

- 92 Wang G. 2010.** Annotation and Classification of Antimicrobials Peptides. In: Wang G., Li X. & Zasloff M. (Eds). *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies*. 18th. edn. England: Wallingford, p.5.
- 93 Whittaker R.H. 1969.** New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*. 163(3863): 150-160.
- 94 Yamada K. & Natori S. 1994.** Characterization of the antimicrobial peptide derived from sapecin B, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochemical Journal*. 298(3): 623-628.
- 95 Yamaguchi A., Ohmori H., Kaneko-Okdera M., Nomura T. & Sawai T. 1991.** Delta ph-dependent accumulation of tetracycline in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 35(1): 53-56.
- 96 Young N.Y. & Yeaman M.R. 2004.** Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(19): 7363-7368.
- 97 Zasloff M. 1992.** Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 4(1): 3-7.
- 98 Zasloff M. 2002.** Antimicrobial peptides in health and disease. *The New England Journal of Medicine*. 347(15): 1199-1200.
- 99 Zasloff M. 2002.** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 415: 389-395.
- 100 Zhou J., Liao M., Ueda M., Gong H., Xuan X. & Fujisaki K. 2007.** Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Peptides*. 28(6): 1304-1310.