

Imunidade inata no intestino de carrapatos: hemocidinas e outros agentes antimicrobianos

Innate immunity in the tick midgut: hemocidins and other antimicrobial agents

Carlos Eduardo Cruz^{1,2}, Sirlei Daffre¹

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP

Resumo. Os carrapatos são vetores de diversos organismos patogênicos, resultando em graves problemas para a saúde humana e animal. O intestino destes artrópodes constitui a interface primária patógeno-vetor, e o controle microbiano neste órgão pode ser mediado pela atividade de peptídeos antimicrobianos derivados da digestão de hemoproteínas (hemocidinas), lisozimas e defensinas, além de inibidores de proteases e estresse oxidativo. Sendo assim, a competência vetorial dos carrapatos está diretamente relacionada ao seu sistema imune.

Palavras-chave. Carrapato, imunidade inata, hemocidinas, controle microbiano.

Abstract. Ticks are vectors of various pathogens, resulting in severe human and animal health problems. The midgut of these arthropods constitutes the primary pathogen-vector interface, and microbial control in this organ may be mediated by the activity of antimicrobial peptides derived from the digestion of heme-containing proteins (hemocidins), lysozymes and defensins, as well as protease inhibitors and oxidative stress. Thus, vector competence in ticks is directly related with their immune system.

Keywords. Tick, innate immunity, hemocidins, microbial control.

Carrapatos são artrópodes hematófagos capazes de transmitir diversos agentes patogênicos, tais como bactérias, vírus e protozoários, que podem causar doenças tais como encefalites, doença de Lyme, babesiose, teileriose e febre maculosa (Bowman and Nuttall, 2008). No Hemisfério Sul, o carrapato de boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o principal ectoparasita de bovinos. O impacto econômico deste parasitismo é da ordem de dezenas de bilhões de dólares anuais e é uma das principais causas da baixa produtividade na bovinocultura mundial (Jonsson, 2006; Jonsson *et al.*, 2008).

Durante a alimentação sanguínea, os carrapatos adquirem agentes patogênicos presentes no sangue do hospedeiro vertebrado, tais como os protozoários intraeritrocíticos dos gêneros *Anaplasma* e *Babesia*, e podem se tornar vetores eficientes de tais agentes (Bock *et al.*, 2008; Kocan *et al.*, 2010). Desta forma, o intestino destes artrópodes é a interface primária da interação patógeno-vetor.

A habilidade dos patógenos de sobreviver no lumen intestinal, penetrar e se multiplicar no epitélio intestinal, antes de alcançar a hemocele (cavidade corporal) e invadir outros órgãos (como glândulas salivares e ovários), é essencial para a sua sobrevivência e determinação da capacidade vetorial (de la Fuente *et al.*, 2007). Sendo assim, o intestino de carrapatos deve apresentar mecanismos de

defesa inata eficientes, capazes de controlar o desenvolvimento e multiplicação de tais agentes patogênicos (Taylor, 2006; Sonenshine and Hynes, 2008), mas preservando a microbiota intestinal, como acontece em *Drosophila melanogaster* (Ha *et al.*, 2009). Em adição à imunidade intestinal, diversos mecanismos de defesa em carrapatos vão agir em outros compartimentos colonizados por patógenos, tais como hemocele, glândulas salivares e ovários (Taylor, 2006; Sonenshine and Hynes, 2008).

Hemoglobina como fonte de peptídeos bioativos

Além de sua função primária como transportadora de oxigênio, a hemoglobina constitui uma importante fonte de peptídeos biologicamente ativos, desempenhando atividades opióides, analgésicas, hemopoiéticas, vasoconstritoras e anticoncepcionais (Ivanov *et al.*, 2005). Adicionalmente, verificou-se que as subunidades α e β da hemoglobina de diversos vertebrados apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Parish *et al.*, 2001) e, nos últimos 10 anos, vários trabalhos têm descrito a atividade antimicrobiana de peptídeos derivados da hidrólise química ou enzimática de hemoproteínas (Froidevaux *et al.*, 2001; Liepke *et al.*, 2003; Mak *et al.*, 2004; Daoud *et al.*, 2005; Nedjar-Arroume *et al.*, 2006; Nedjar-Arroume *et al.*, 2008). Tais peptídeos an-

Contato do autor:

¹carlcruz@usp.br

Recebido 05out10

Aceito 30mar11

Publicado

timicrobianos passaram a ser coletivamente denominados hemocidinas (Mak *et al.*, 2000).

Considerando que a hemoglobina do sangue do hospedeiro sofre proteólise no intestino do carrapato e pode gerar hemocidinas (Fogaca *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2003b; Sonenshine *et al.*, 2005), estas moléculas podem constituir um componente importante da imunidade inata neste órgão (Kopacek *et al.*, 2010). De fato, um peptídeo antimicrobiano purificado do intestino do carrapato bovino *R. (B.) microplus* foi descrito em 1999, e este foi o primeiro relato de uma hemocidina produzida *in vivo* através de atividade proteolítica endógena (Fogaca *et al.*, 1999). Este peptídeo, denominado Hb 33-61, apresenta massa molecular de 3.205 Da e atividade contra bactérias gram-positivas e fungos, e corresponde aos aminoácidos 33 a 61 da subunidade α da hemoglobina bovina (Fogaca *et al.*, 1999). A estrutura terciária do peptídeo sintético de carboxila amidada, Hb 33-61a, foi elucidada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) na presença de micelas de dodecil sulfato de sódio (SDS), sugerindo que a molécula é responsável pela permeabilização da membrana plasmática de agentes patogênicos, tais como a levedura *Candida albicans* (Sforca *et al.*, 2005). Posteriormente outras hemocidinas foram identificadas nesta mesma espécie de carrapato (Cruz *et al.*, 2010).

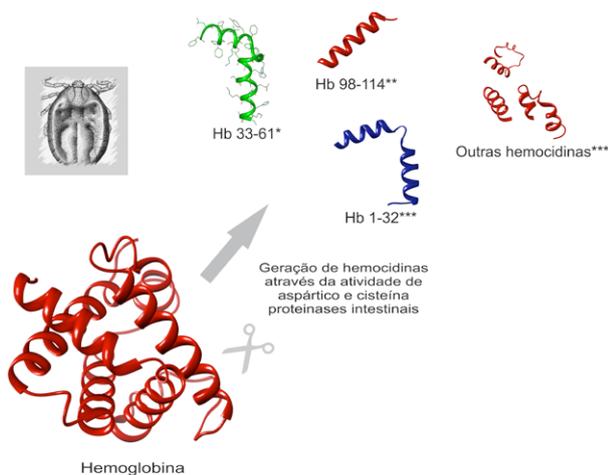


Figura 1. Geração de peptídeos antimicrobianos (hemocidinas) resultantes da hemoglobinólise ácida no intestino do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. * Hemocidina purificada a partir do extrato intestinal [Fogaça e col. (1999)]; ** Hemocidina isolada a partir de extratos ácidos do intestino [Belmonte (2011, em prep.)]; *** Hemocidina obtida através de hemoglobinólise *in vitro* [Cruz e col. (2010)].

Outras hemocidinas foram isoladas do lúmen intestinal do carrapato argasídeo *Ornithodoros moubata*, provenientes da proteólise endógena da subunidade α da hemoglobina de coelhos, e estes peptídeos apresentaram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* (Nakajima *et al.*, 2003b). Hemocidinas ativas contra *Micrococcus luteus* também foram identificadas em extratos do intestino do carrapato ixodídeo *Dermacentor variabilis* (Sonenshine *et al.*, 2005), sugerindo que mecanismos imunes similares nas duas principais famílias de carrapatos, Ixodidae e Argasidae, utilizam a

hemoglobina do hospedeiro como agentes de controle microbiano no intestino.

Acredita-se que hemocidinas sejam geradas através de proteólise em vesículas ácidas presentes em células digestórias (Lara *et al.*, 2005), através da ação de uma rede de aspártico e cisteína proteinases (Sojka *et al.*, 2008; Horn *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2010) (Figura 1). Interessantemente, a rede de proteinases caracterizada em carrapatos apresenta uma similaridade marcante com cascatas de proteinases já descritas em outros parasitas, tais como plelmintos e nematóides (Caffrey *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2004; Delcroix *et al.*, 2006). Esta rede de proteinases participa na geração de hemocidinas (Cruz *et al.*, 2010) que potencialmente conferem proteção contra patógenos invasores. Além disso, tais proteinases podem servir como alvo para o desenvolvimento de vacinas para o controle de populações de carrapatos e na regulação de sua capacidade vetorial (Tsuji *et al.*, 2008; Parizi *et al.*, 2009).

Muitas hemocidinas são catiônicas, apresentam alta porcentagem de estrutura em α -hélice (Nedjar-Arroume *et al.*, 2008), e a sua atividade antimicrobiana ocorre através da permeabilização da membrana celular (Lindberg *et al.*, 2001; Sforca *et al.*, 2005). Em humanos, hemocidinas já foram identificadas no sangue menstrual (Mak *et al.*, 2004) e na placenta (Liepke *et al.*, 2003).

Outras moléculas envolvidas na resposta imune no intestino de carrapatos

Outras moléculas podem contribuir para a imunidade intestinal, tais como lisozimas, defensinas e inibidores de proteases, conjuntamente com mecanismos de estresse oxidativo.

Lisozimas: são enzimas capazes de hidrolisar ligações glicosídicas de peptidoglicanos que constituem a parede celular de muitas bactérias, atuando assim como potentes agentes antimicrobianos.

Lisozimas do tipo C foram identificadas em algumas espécies de carrapatos. Em *Ornithodoros moubata* foi caracterizada uma lisozima com atividade anti-*Micrococcus luteus* (Kopacek *et al.*, 1999) e o seu nível de expressão aumentou após a alimentação sanguínea (Grunclova *et al.*, 2003).

Em *Dermacentor variabilis* também foi verificado que uma lisozima é expressa no intestino (Ceraul *et al.*, 2007). Embora o nível de transcrição deste gene não tenha aumentado após a alimentação sanguínea, a sua expressão foi aumentada em carrapatos infectados artificialmente com *Rickettsia montanensis* (Ceraul *et al.*, 2007).

Defensinas: são proteínas catiônicas ricas em cisteína capazes de formar poros na membrana de bactérias e fungos. Quatro isoformas de defensinas descritas em *Ornithodoros moubata* (A, B, C e D) tiveram seus níveis de expressão aumentados após a alimentação sanguínea (Nakajima *et al.*, 2001; Nakajima *et al.*, 2002). A isoforma A da defensina foi purificada do conteúdo intestinal e apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* (Nakajima *et al.*, 2002). A sua forma recombinante foi

ativa contra bactérias gram-positivas, permeabilizando a membrana bacteriana, mas não foi ativa contra bactérias gram-negativas (Nakajima *et al.*, 2003a).

Uma defensina de *Haemaphysalis longicornis* foi expressa especificamente no intestino e o seu nível de expressão aumentou após injeção de lipopolissacarídeo (LPS) na hemocele (Zhou *et al.*, 2007). Defensinas predominantemente expressas no intestino também foram descritas em outros ixodídeos: *Ixodes ricinus* (Rudenko *et al.*, 2005), *Ixodes scapularis* (Hynes *et al.*, 2005) e *Ixodes persulcatus* (Saito *et al.*, 2009). A comparação de defensinas sintéticas de diferentes ixodídeos revelou que todas elas são ativas contra *Staphylococcus aureus*. Contudo, uma espécie de *Borrelia*, agente etiológico da doença de Lyme, mostrou-se resistente à atividade de defensina, sugerindo que tais bactérias podem se adaptar aos mecanismos imunes do carrapato (Isogai *et al.*, 2009).

Longicinas: são peptídeos antimicrobianos estruturalmente semelhantes às defensinas e identificados no intestino de *Haemaphysalis longicornis* (Tsuji *et al.*, 2007). A forma recombinante de uma longicina foi ativa contra uma ampla gama de microorganismos, incluindo bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, além de apresentar atividade anti-*Babesia in vitro* (Tsuji and Fujisaki, 2007; Rahman *et al.*, 2010). Em um experimento *in vivo*, a inoculação de longicina reduziu significativamente a parasitemia em camundongos infectados com *Babesia microti*. Adicionalmente, experimentos com RNA de interferência dão suporte à função destas proteínas na transmissão de *Babesia* e na regulação da capacidade vetorial de *Haemaphysalis longicornis* (Tsuji *et al.*, 2007).

Inibidores de proteases: são moléculas capazes de inibir a atividade de diversas classes de proteases. Podem desempenhar um papel importante na imunidade intestinal através da inibição de proteinases específicas produzidas por microorganismos.

No intestino de *Haemaphysalis longicornis*, o nível de expressão de um inibidor de cisteína proteinase da classe das cistatinas (Hlcyst-2) aumentou em resposta à alimentação sanguínea, à injeção de LPS e à infecção experimental com *Babesia gibsoni*. A forma recombinante deste inibidor produziu um efeito negativo no crescimento de *Babesia bovis* em cultura (Zhou *et al.*, 2006).

Ao contrário da maioria dos inibidores do tipo Kunitz, que são expressos nas glândulas salivares para o controle da hemostasia do hospedeiro, um inibidor deste tipo (designado KPI), foi expresso no intestino de *Dermacentor variabilis* em resposta à alimentação sanguínea, e os seus níveis de transcrição foram induzidos após infecção com riquetsias (Ceraul *et al.*, 2008). Além de sua atividade de inibição de serina proteinases e possível função anticoagulante, foi demonstrado que a KPI limita a colonização de riquetsias em fibroblastos de camundongos (Ceraul *et al.*, 2008).

Estresse oxidativo: sabe-se que o epitélio intestinal de *Drosophila* controla de forma eficiente e específica a

microbiota bacteriana, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Ha *et al.*, 2005; Ha *et al.*, 2009), e suporta a hipótese de que mecanismos de estresse oxidativo devem contribuir para a imunidade intestinal em carrapatos.

Várias enzimas antioxidantes tiveram sua expressão gênica aumentada em diferentes espécies de carrapatos em resposta à infecção por patógenos e/ou alimentação sanguínea, como é o caso da glutathione S-transferase (Mullenga *et al.*, 2003; Rudenko *et al.*, 2005; Dreher-Lesnick *et al.*, 2006). Adicionalmente, observou-se que uma catalase, enzima responsável pela detoxificação do peróxido de hidrogênio, desempenha uma função importante na regulação do estresse oxidativo no intestino de *R. (B.) microplus* (Citelli *et al.*, 2007). Interessantemente, a análise do transcriptoma do intestino de *D. variabilis* resultou na identificação de transcritos de outras enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase e tioredoxina (Anderson *et al.*, 2008).

Considerações finais

Considerando que os carrapatos adquirem diversos microorganismos do hospedeiro vertebrado e podem se tornar vetores eficientes de patógenos, o seu intestino deve apresentar sistemas eficientes de controle microbiano. Componentes importantes da imunidade intestinal podem incluir hemocidinas, geradas endogenamente através de atividade proteolítica de hemeproteínas do hospedeiro vertebrado, além de moléculas de defesa secretadas pelo epitélio intestinal, tais como defensinas, lisozimas e inibidores de proteinases. Adicionalmente, outros agentes microbicidas podem limitar a proliferação de patógenos neste órgão, tais como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, embora este ainda seja um campo a ser explorado. De fato, as pesquisas em imunidade inata em carrapatos, e o seu papel no controle de patógenos, estão se iniciando com a era pós-genômica. Técnicas mais recentes de genética reversa, que objetivam determinar quais fenótipos ocorrem como resultado da expressão de genes específicos, e a genômica funcional, baseada no silenciamento de genes específicos através da técnica de RNA de interferência, irão gerar informações que permitirão decifrar os mecanismos de controle dos vetores sobre seus patógenos.

Agradecimentos

Leopoldo Francisco Barletta Marchelli pelos comentários e sugestões.

Bibliografia

- Anderson, J. M., Sonenshine, D. E. and Valenzuela, J. G. (2008). Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics* 9: 552.
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A. and Jorgensen, W. 2008. Ticks: biology, disease and control. In: Bowman, A.S. and Nuttall, P. Ticks: Biology, Disease and Control: p. 281-307.
- Bowman, A. S. and Nuttall, P. A., Eds. 2008. Ticks: Biology, disease and control. Cambridge, Cambridge University

- Press.
- Caffrey, C. R., McKerrow, J. H., Salter, J. P. and Sajid, M. (2004). Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol* 20(5): 241-8.
- Ceraul, S. M., Dreher-Lesnack, S. M., Gillespie, J. J., Rahman, M. S. and Azad, A. F. (2007). New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. *Infect Immun* 75(4): 1973-83.
- Ceraul, S. M., Dreher-Lesnack, S. M., Mulenga, A., Rahman, M. S. and Azad, A. F. (2008). Functional characterization and novel rickettsiostatic effects of a Kunitz-type serine protease inhibitor from the tick *Dermacentor variabilis*. *Infect Immun* 76(11): 5429-35.
- Citelli, M., Lara, F. A., da Silva Vaz, I., Jr. and Oliveira, P. L. (2007). Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Mol Biochem Parasitol* 151(1): 81-8.
- Cruz, C. E., Fogaca, A. C., Nakayasu, E. S., Angeli, C. B., Belmonte, R., Almeida, I. C., Miranda, A., Miranda, M. T., Tanaka, A. S., Braz, G. R., Craik, C. S., Schneider, E., Caffrey, C. R. and Daffre, S. (2010). Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. *Parasit Vectors* 3: 63.
- Daoud, R., Dubois, V., Bors-Dodita, L., Nedjar-Arroume, N., Krier, F., Chihib, N. E., Mary, P., Kouach, M., Briand, G. and Guillochon, D. (2005). New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides* 26(5): 713-9.
- de la Fuente, J., Blouin, E. F., Manzano-Roman, R., Naranjo, V., Almazan, C., Perez de la Lastra, J. M., Zivkovic, Z., Jongejan, F. and Kocan, K. M. (2007). Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. *Genomics* 90(6): 712-22.
- Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C. R., Lim, K. C., Dvorak, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C. and McKerrow, J. H. (2006). A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J Biol Chem* 281(51): 39316-29.
- Dreher-Lesnack, S. M., Mulenga, A., Simser, J. A. and Azad, A. F. (2006). Differential expression of two glutathione S-transferases identified from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Mol Biol* 15(4): 445-53.
- Fogaca, A. C., da Silva, P. I., Jr., Miranda, M. T. M., Bianchi, A. G., Miranda, A., Ribolla, P. E. and Daffre, S. (1999). Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem* 274(36): 25330-4.
- Froidevaux, R., Krier, F., Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Kosciarsz, E., Ruckebusch, C., Dhulster, P. and Guillochon, D. (2001). Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Lett* 491(1-2): 159-63.
- Grunclova, L., Fouquier, H., Hypsa, V. and Kopacek, P. (2003). Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Dev Comp Immunol* 27(8): 651-60.
- Ha, E. M., Lee, K. A., Seo, Y. Y., Kim, S. H., Lim, J. H., Oh, B. H., Kim, J. and Lee, W. J. (2009). Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in *Drosophila* gut. *Nat Immunol* 10(9): 949-57.
- Ha, E. M., Oh, C. T., Bae, Y. S. and Lee, W. J. (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310(5749): 847-50.
- Horn, M., Nussbaumerova, M., Sanda, M., Kovarova, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C. R., Kopacek, P. and Mares, M. (2009). Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chem Biol* 16(10): 1053-63.
- Hynes, W. L., Ceraul, S. M., Todd, S. M., Seguin, K. C. and Sonenshine, D. E. (2005). A defensin-like gene expressed in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Med Vet Entomol* 19(4): 339-44.
- Isogai, E., Isogai, H., Takahashi, K., Kobayashi-Sakamoto, M. and Okumura, K. (2009). Antimicrobial activity of three tick defensins and four mammalian cathelicidin-derived synthetic peptides against Lyme disease spirochetes and bacteria isolated from the midgut. *Exp Appl Acarol* 49(3): 221-8.
- Ivanov, V. T., Karelin, A. A. and Yatskin, O. N. (2005). Generation of peptides by human erythrocytes: facts and artifacts. *Biopolymers* 80(2-3): 332-46.
- Jonsson, N. N. (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol* 137(1-2): 1-10.
- Jonsson, N. N., Bock, R. E. and Jorgensen, W. K. (2008). Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet Parasitol* 155(1-2): 1-9.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F. and Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol* 167(2-4): 95-107.
- Kopacek, P., Hajdusek, O., Buresova, V. and Daffre, S. 2010. Tick innate immunity. In: Kenneth Soderhall. **Invertebrate immunity**. Austin, TX, Landes Bioscience.
- Kopacek, P., Vogt, R., Jindrak, L., Weise, C. and 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): 989-97.
- Lara, F. A., Lins, U., Bechara, G. H. and Oliveira, P. L. (2005). Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J Exp Biol* 208(16): 3093-101.
- Liepkke, C., Baxmann, S., Heine, C., Breithaupt, N., Standker, L. and Forssmann, W. G. (2003). Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 791(1-2): 345-56.
- Lindberg, M., Jarvet, J., Langel, U. and Graslund, A. (2001). Secondary structure and position of the cell-penetrating peptide transportin in SDS micelles as determined by NMR. *Biochemistry* 40(10): 3141-9.
- Mak, P., Wojcik, K., Silberring, J. and Dubin, A. (2000). Antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins: hemocidins. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77(3): 197-207.
- Mak, P., Wojcik, K., Wicherek, L., Suder, P. and Dubin, A. (2004). Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides* 25(11): 1839-47.
- Mulenga, A., Macaluso, K. R., Simser, J. A. and Azad, A. F. (2003). Dynamics of *Rickettsia*-tick interactions: identification and characterization of differentially expressed mRNAs in uninfected and infected *Dermacentor variabilis*. *Insect Mol Biol* 12(2): 185-93.
- Nakajima, Y., Ishibashi, J., Yukuhiro, F., Asaoka, A., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2003a). Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1624(1-3): 125-30.
- Nakajima, Y., Ogihara, K., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2003b). Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of

- the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *J Med Entomol* 40(1): 78-81.
- Nakajima, Y., van Naters-Yasui, A. G., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2001). Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochem Mol Biol* 31(8): 747-51.
- Nakajima, Y., van Naters-Yasui, A. V., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2002). Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *Insect Molecular Biology* 11(6): 611-8.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E. Y., Traisnel, J., Krier, F., Mary, P., Kouach, M., Briand, G. and Guillochon, D. (2008). Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides* 29(6): 969-77.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Miloudi, K., Daoud, R., Krier, F., Kouach, M., Briand, G. and Guillochon, D. (2006). Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides* 27(9): 2082-9.
- Parish, C. A., Jiang, H., Tokiwa, Y., Berova, N., Nakanishi, K., McCabe, D., Zuckerman, W., Xia, M. M. and Gabay, J. E. (2001). Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. *Bioorg Med Chem* 9(2): 377-82.
- Parizi, L. F., Pohl, P. C., Masuda, A. and Vaz Ida, S., Jr. (2009). New approaches toward anti-*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick vaccine. *Rev Bras Parasitol Vet* 18(1): 1-7.
- Rahman, M., Tsuji, N., Boldbaatar, D., Battur, B., Liao, M., Umemiya-Shirafuji, R., You, M., Tanaka, T. and Fujisaki, K. (2010). Structural characterization and cytolytic activity of a potent antimicrobial motif in longicin, a defensin-like peptide in the tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Vet Med Sci* 72(2): 149-56.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Edwards, M. J. and Grubhoffer, L. (2005). Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. *J Med Entomol* 42(1): 36-41.
- Saito, Y., Konnai, S., Yamada, S., Imamura, S., Nishikado, H., Ito, T., Onuma, M. and Ohashi, K. (2009). Identification and characterization of antimicrobial peptide, defensin, in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. *Insect Mol Biol* 18(4): 531-9.
- Sforca, M. L., Machado, A., Figueredo, R. C., Oyama, S., Jr., Silva, F. D., Miranda, A., Daffre, S., Miranda, M. T. M., Spisni, A. and Pertinhez, T. A. (2005). The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. *Biochemistry* 44(17): 6440-51.
- Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdusek, O., Caffrey, C. R., Mares, M. and Kopacek, P. (2008). Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasit Vectors* 1(1): 7.
- Sonenshine, D. E. and Hynes, W. L. (2008). Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Front Biosci* 13: 7046-63.
- Sonenshine, D. E., Hynes, W. L., Ceraul, S. M., Mitchell, R. and Benzine, T. (2005). Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. *Exp Appl Acarol* 36(3): 207-23.
- Taylor, D. (2006). Innate immunity in ticks: a review. *J Acarol Soc Jpn* 15: 109-27.
- Tsuji, N., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Miyoshi, T., Xuan, X., Oliver, J. H., Jr. and Fujisaki, K. (2007). Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. *Infect Immun* 75(7): 3633-40.
- Tsuji, N. and Fujisaki, K. (2007). Longicin plays a crucial role in inhibiting the transmission of *Babesia* parasites in the vector tick *Haemaphysalis longicornis*. *Future Microbiol* 2: 575-8.
- Tsuji, N., Miyoshi, T., Battsetseg, B., Matsuo, T., Xuan, X. and Fujisaki, K. (2008). A cysteine protease is critical for *Babesia* spp. transmission in *Haemaphysalis* ticks. *PLoS Pathog* 4(5): e1000062.
- Williamson, A. L., Lecchi, P., Turk, B. E., Choe, Y., Hotez, P. J., McKerrow, J. H., Cantley, L. C., Sajid, M., Craik, C. S. and Loukas, A. (2004). A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *J Biol Chem* 279(34): 35950-7.
- Zhou, J., Liao, M., Ueda, M., Gong, H., Xuan, X. and Fujisaki, K. (2007). Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Peptides* 28(6): 1304-10.
- Zhou, J., Ueda, M., Umemiya, R., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Xuan, X. and Fujisaki, K. (2006). A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 36(7): 527-35.