

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**MECANISMOS DE INTERAÇÃO DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus*
COM O FUNGO ACAROPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae***

Tese de Doutorado

ANELISE WEBSTER DE MOURA VIEIRA ARAÚJO

Porto Alegre, Dezembro de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**MECANISMOS DE INTERAÇÃO DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus*
COM O FUNGO ACAROPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular do Centro de
Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Co-orientador: Dr. Guilherme Marcondes Klafke

Porto Alegre, Dezembro de 2017.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor RS e no Cattle Fever Tick Research Laboratory.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

“Continuaremos!”

João Ricardo de Souza Martins

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria Rita Webster de Moura.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho foi possível a partir da interação entre os pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia da UFRGS (Dr. Augusto Schrank e Dra. Marilene Henning Vainstein) do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (Dr. João Ricardo Martins, Dr. José Reck e Dr. Guilherme Klafke), e do Cattle Fever Tick Research Laboratory – EUA (Dr. Robert Miller e Msc. Jason Tidwell).

Ao meu orientador Dr. Augusto Schrank e à professora Dra. Marilene Vainstein por mais uma oportunidade e confiança no desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. João Ricardo Martins, exemplo de profissional e de ser humano. Por ter me acolhido em seu laboratório e ter me mostrado “que a verdadeira conquista está na caminhada e não no topo”.

Ao Dr. José Reck, amigo sincero, profissional espetacular e um ser humano diferenciado sempre disposto a ajudar, questionar e extrair o melhor de cada um. A você, meu respeito, admiração e gratidão. Essencial neste e em muitos outros projetos, profissionais e pessoais. Obrigada por todos os ensinamentos, por todos os “puxões de orelha” e por todas as palavras amigas.

Ao Dr. Guilherme Klafke por ter me ensinado muito do que eu sei sobre resistência à acaricidas. Serei sempre muito grata por todos os momentos de discussão e decisões com relação à execução dos experimentos. Obrigada por ter me acolhido e me dado suporte no período em que estive nos EUA para desenvolver parte deste projeto. Um agradecimento especial por ter aberto as portas da sua casa e ter me dado a oportunidade de conviver com a sua linda família.

Aos colegas do Laboratório de Fungos Filamentosos (Lab. 217) Ângela Junges, Nicolau Sbaraini, Eder Oliveira e Thais Campos que apesar da pequena convivência

sempre fizeram com que eu me sentisse parte da equipe. E aos colegas de outros laboratórios, pela convivência, aprendizado durante as disciplinas, pelas conversas de corredor, pelas risadas, pelos desabafos.

Ao Luciano e à Silvia, secretários do PPGBCM, por toda ajuda, paciência e eficiência.

À Dra Livia Kmetzsch revisora da redação científica, por todas as sugestões.

Ao Dr. Charley Staats relator desta tese pela disponibilidade.

Aos integrantes da comissão avaliadora, Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro, Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira e Prof. Dr. Charley Christian Staats pelo pronto aceite do convite para comporem a minha banca e pela revisão desta tese.

À CAPES e ao CNPq pelo financiamento deste trabalho.

Ao Dr. Robert Miller por me receber em seu laboratório e permitir a execução de parte importante deste projeto. Ao Msc. Jason Tidwell, pela ajuda fundamental na análise dos dados de transcriptoma deste projeto.

Ao Dr. Donald Thomas por estar sempre disponível, ter me acolhido de forma tão carinhosa, pela parceria e horas de descontração nas viagens e congressos.

Aos amigos e colegas do Cattle Fever Tick Research Laboratory, Charluz Arocho, Brenda Leal, Ruby Martynez e Michael Moses. Muito obrigada pelos ensinamentos compartilhados, momentos de descontração e parceria durante o tempo em que estivemos juntos.

A todos do Instituto de Pesquisa Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) pelo apoio e oportunidade de realizar este projeto.

Aos membros da família “Laboratório de Parasitologia” do IPVDF. Sou extremamente privilegiada por fazer parte desta equipe!

À Dra. Rovaina Doyle pela agradável convivência e ensinamentos passados.

Ao Dr. Prof. João Carlos Gonzalez pela experiência compartilhada.

Aos colegas e amigos Thais Michel, Michelle Peres, Viviane Kelin, Luiz Henrique de La Canal, Endrigo Pradel, Simone Becker, Bárbara Weck, Marcelo Becker, Diogo Schott, Rafael Barretto, Bruna Leal, Thamiris Padilha, Paola Antunes e Fabrício Tiberê pela convivência agradabilíssima e por me mostrarem o sentido do trabalho em equipe.

Ao amigo-irmão Bruno Dall’Agnol, por estar sempre presente e compartilhar dos bons e maus momentos. Obrigada por me provar que ainda existem pessoas que pensam no próximo e se dedicam a fazer um mundo melhor!

Aos amigos que mesmo distantes sempre mandaram força e palavras de incentivo.

Aos membros das famílias Webster, Moura, Vieira, Araújo e Passos pelo carinho, incentivo e apoio constante. Ao meu irmão, Fernando, meu amor maior, pela cumplicidade e amor incondicional. Às minhas avós, Myrtem e Neila, meus exemplos de força e fé!
AMO VOCÊS!

Ao meu marido, Ugo Araújo. Literalmente, meu anjo! Obrigada por todo amor e companheirismo. Esta vitória não seria alcançada se não estivesses do meu lado! TE AMO!

À minha mãe, Rita Webster, meu orgulho, meu porto seguro, meu maior exemplo de mulher, de força, de coragem, de honestidade, de profissionalismo, e principalmente de ser humano! POR VOCÊ E PARA VOCÊ, SEMPRE!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Características gerais do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	14
1.2 Biologia	15
1.3 Importância econômica	16
1.3.1 Impacto direto	17
1.3.2 Impacto indireto e custos de tratamento	17
1.4 Controle químico e resistência do <i>R. microplus</i>	18
1.4.1 Mecanismos de resistência	19
1.4.2 Mecanismos de resistência à piretróides	20
1.5 Controle biológico e fungos entomopatogênicos no processo de infecção	23
1.5.1 Modo de ação	25
1.5.2 <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
1.5.3 Processo de infecção	26
1.6 Defesa dos artrópodes contra fungos entomopatogênicos	28
1.6.1 Cutícula como barreira para infecções fúngicas	29
1.6.2 Visão geral dos mecanismos de defesa imune de artrópodes	29
1.6.3 Reconhecimento de fungos pelo sistema imune	31
1.6.4 Respostas imunes celulares para fungos	32
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. PARTE EXPERIMENTAL & RESULTADOS	35
3.1. Comparative study between Larval Packet Test and Larval Immersion Test to assess the effect of <i>Metarhizium anisopliae</i> upon <i>Rhipicephalus microplus</i> tick larvae (manuscrito submetido ao periódico <i>Experimental and Applied Acarology</i>).	36
3.2. Does the effect of <i>Metarhizium anisopliae</i> isolate on <i>Rhipicephalus microplus</i> depend on the tick population avaluated? (artigo publicado no periódico <i>Ticks and Tick-borne Diseases</i>).	50

3.3. Análise transcriptômica de larvas de <i>R. microplus</i> expostas a <i>M. anisopliae</i>, cipermetrina e sua associação.	73
3.3.1 Introdução	74
3.3.2 Materiais e métodos	75
3.3.3 Resultados e discussão	80
3.3.4. Conclusões	104
3.3.5 Bibliografia	105
4. DISCUSSÃO GERAL	111
5. CONCLUSÕES	117
6. REFERÊNCIAS	118
7. ANEXOS	126
7.1 Currículo lattes	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior
±	Mais ou menos
≈	Aproximadamente
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
°C	Graus Celsius
BPO	Butóxido de piperonila
CAPES	Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> , Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
g	Gramma
h	Hora
ha	Hectare
IE	Índice de eficácia (%)
IPVDF	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
IR	Índice reprodutivo
Kg	Quilograma
L	Litro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
OF	Organofosforado
OIE	<i>Office International des Epizooties</i> , Organização Mundial de Saúde Animal
OP	Organophosphate
PS	Piretróide Sintético
psi	“Pounds per square inch”
SP	Syntetic Pyrethroid
TL ₅₀	Tempo Letal para 50% da população
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UR	Umidade relativa
v/v	Volume por volume

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é o principal ectoparasita de bovinos. O controle de *R. microplus* baseia-se principalmente no uso de acaricidas químicos, o que contribuiu para o problema emergente da seleção de populações de carrapatos resistentes. Portanto, há a necessidade do desenvolvimento de métodos mais eficientes/sustentáveis de controle, como o controle biológico utilizando fungos acaropatógenicos. A eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* de forma isolada ou em associação com acaricida químico para controle do carrapato bovino já foi evidenciada em condições de campo utilizando uma cepa de carrapatos resistente à acaricidas. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares de *R. microplus* envolvidos na sua interação com *M. anisopliae* e com acaricidas. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta de larvas de *R. microplus* expostas ao fungo, ao acaricida e à associação de ambos. Primeiramente foi realizado um estudo para determinar a metodologia mais indicada para avaliar o efeito *in vitro* do fungo *M. anisopliae* sobre larvas de *R. microplus*. Para isso, comparamos o Teste de Pacote de Larvas modificado (TPL) e o Teste de Imersão de Larvas (TIL). Os valores de tempo letal mediano (TL₅₀) obtido na maior concentração de *M. anisopliae* (10⁸conídios/mL) foram 24,8 e 9,2 dias para o TPL e TIL, respectivamente. A mortalidade após 21 dias foi de 38% e 98% para o TPL e TIL respectivamente, na mesma concentração. O TIL demonstrou ser o teste mais indicado a ser utilizado, sendo, portanto, escolhido para realização dos experimentos futuros. Em seguida foi realizado um estudo para comparar a suscetibilidade de diferentes isolados de *R. microplus* ao fungo *M. anisopliae*. Foram avaliados 67 isolados de campo. Para tanto, as larvas de *R. microplus* foram imersas em uma suspensão de *M. anisopliae* (10⁸conídios/mL) durante 5 min. Os tempos letais medianos (TL₅₀) variaram de 2,6 a 24,9 dias. A mortalidade observada no 15º dia após o tratamento variou de 26,3 a 100% nas amostras testadas. Esses resultados demonstraram que as populações de campo de *R. microplus* apresentam uma alta variação em sua suscetibilidade a *M. anisopliae*. Por fim, foi realizada uma análise transcricional (RNAseq) de larvas de *R. microplus* expostas a *M. anisopliae*, cipermetrina, associação de ambos e do controle (não-tratado). A análise dos transcritos dos quatro grupos gerou um total de 507.792 seqüências com um tamanho total de 303.160.891 pb. Foram encontrados 31 genes diferencialmente expressos no grupo controle quando comparado com *M. anisopliae*, 39 com cipermetrina e 73 com *M. anisopliae* + cipermetrina. *M. anisopliae* e o grupo da associação apresentaram 81 genes diferencialmente expressos e *M. anisopliae* e cipermetrina, 46. Houve 177 genes diferencialmente expressos ao comparar *M. anisopliae* + cipermetrina com larvas expostas à cipermetrina. Os resultados deste estudo demonstraram que a associação *M. anisopliae* + cipermetrina aumentou a expressão de genes relacionados a resposta à agressão, provavelmente pelo fato da associação provocar uma agressão maior ao carrapato e este responder de forma mais rápida, levando à superexpressão de genes de defesa. As descobertas deste estudo fornecem informações sobre as vias e mecanismos moleculares de *R. microplus* ativados em resposta à interação de *M. anisopliae* e a acaricida. Além disso, esses estudos estabelecem as bases para pesquisas futuras sobre genes-chave que controlam a suscetibilidade de *R. microplus* a *M. anisopliae*. O sinergismo evidenciado em nossos estudos comprova a ideia de que o controle integrado, utilizando o controle biológico com o controle químico é uma opção tanto para o controle de cepas de carrapatos resistentes à acaricidas, quanto para um controle mais rápido de cepas de carrapatos que não apresentam resistência ou que apresentem resistência intermediária.

Palavras-chave: Controle biológico, fungo acaropatógeno, carrapato, acaricida, controle integrado, RNAseq, sinergismo.

ABSTRACT

The tick *Rhipicephalus microplus* is the major cattle ectoparasite. The control of *R. microplus* is based mainly on the use of chemical acaricides, which contributed to the emerging problem of the selection of tick populations resistant to acaricides. Therefore, there is a need for the development of more efficient/sustainable methods of control, such as biological control using acari pathogenic fungi. The effectiveness of the fungus *Metarhizium anisopliae* alone or in association with chemical acaricide to control the bovine tick has already been evidenced under field conditions using an acaricide resistant tick strain. However, to date, little is known about the molecular pathways of *R. microplus* involved with its interaction with *M. anisopliae* and with acaricides. Thus, the aim of the present study is to evaluate the response of *R. microplus* larvae exposed to the fungus, the acaricide and the association of both. Firstly, a study was carried out to determine the most appropriate methodology to evaluate the *in vitro* effect of the fungus *M. anisopliae* on larvae of *R. microplus* tick. For this, we compared the Modified Larval Packet Test (LPT) and the Larval Immersion Test (LIT). The values of lethal time (LT₅₀) obtained in the highest concentration of *M. anisopliae* (10⁸conidia / mL) were 24.8 and 9.2 days for LPT and LIT, respectively. Mortality after 21 days was 38% and 98% for LPT and LIT, respectively, at the same concentration. The LIT proved to be the most indicated test to be used and was therefore chosen to carry out the following experiments. Then, a study was performed to compare the susceptibility of different *R. microplus* isolates to *M. anisopliae* fungus. Sixty-seven field isolates were evaluated. For this, *R. microplus* larvae were immersed in a suspension of *M. anisopliae* (10⁸conidia/mL) for 5 min. Lethal times (LT₅₀) ranged from 2.6 to 24.9 days. Mortality observed on the 15th day after treatment ranged from 26.3 to 100% in the tested samples. These results demonstrated that *R. microplus* field populations showed a high variation in their susceptibility to *M. anisopliae*. Finally, a RNAseq analysis of *R. microplus* larvae exposed to *M. anisopliae*, cypermethrin, association of both or untreated (control) was performed. Analysis of the transcripts of the four groups generated a total of 507,792 sequences with a total length of 303,160,891 bp. We found 31 differentially expressed genes in the control group when compared to *M. anisopliae*, 39 with cypermethrin and 73 with *M. anisopliae* + cypermethrin. *M. anisopliae* and the association group had 81 differentially expressed genes and *M. anisopliae* and cypermethrin, 46. There were 177 differentially expressed genes when comparing *M. anisopliae* + cypermethrin with cypermethrin exposed larvae. The results of this study demonstrated that the association of *M. anisopliae* + cypermethrin increased the expression of genes related to response to aggression, possibly because the *M. anisopliae* + cypermethrin association causes a greater aggression to the tick and, then it could respond quickly, leading to overexpression of defense genes. The findings of this study provide information on the pathways and molecular mechanisms of *R. microplus* in response to the interaction of *M. anisopliae* and acaricides. In addition, these studies establish the basis for future research on key genes that control the susceptibility of *R. microplus* to *M. anisopliae*. The synergism evidenced in our studies confirms the idea that integrated control using biological control and chemical control is an option both for the control of acaricide resistant tick strains and for a faster control of tick strains that do not show resistance or exhibit intermediate resistance.

Keywords: Biological control, acari pathogenic fungi, tick, acaricide, integrated control, RNAseq, synergism.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do carrapato *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *Rhipicephalus microplus* tem ampla distribuição, sendo encontrado em regiões de clima tropical e subtropical (Figura 1). É considerado originário do sul da Ásia (MURRELL et al., 2001) e se espalhou para grandes áreas de criação de gado, como a América do Sul através de transporte comercial de gado. Dentro de sua área de distribuição, a presença de *R. microplus* depende da distribuição de seu hospedeiro e das condições climáticas. No Brasil, esse ixodídeo é encontrado em quase todos os estados com exceção de algumas regiões do Rio Grande do Sul e do sertão nordestino, visto que as condições climáticas do país são bem favoráveis ao seu desenvolvimento durante a maior parte do ano (ESTRADA-PEÑA et al., 2006). Os bovinos de raças europeias (*Bos taurus taurus*) são mais suscetíveis a esse parasito do que as raças zebuínas (GONZALES, 2003), devido a co-evolução entre os zebuínos e o *R. microplus*, uma vez que ambos tiveram origem na Ásia.

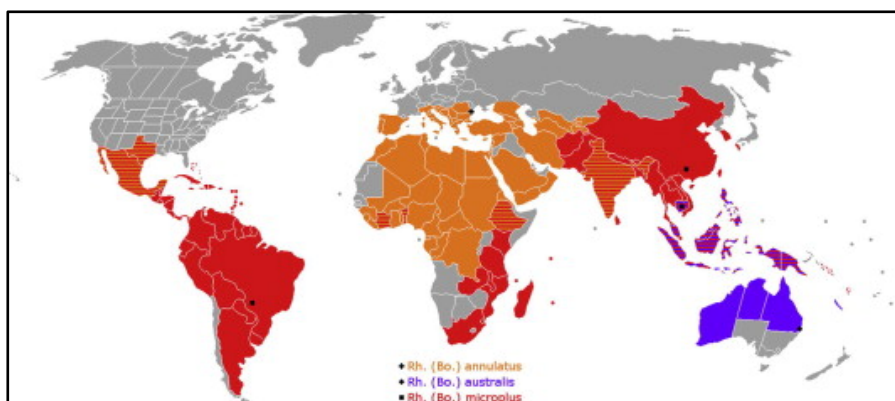


Figura 1. Distribuições globais aproximadas das espécies do complexo *R. microplus*: *R. annulatus*, *R. australis* e *R. microplus*. A distribuição de *R. annulatus* é indicada em laranja, *R. australis* em roxo e *R. microplus* em vermelho (BURGER et al., 2014).

1.2 Biologia

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1988) é um carrapato de hospedeiro único (monoxeno), realizando todas as mudas em um mesmo animal. Seu ciclo de vida é dividido em três estágios (larva, ninfa e adulto). As larvas hexápodas se posicionam no topo da vegetação (Figura 2) e esperam que seus hospedeiros passem e no momento do encontro, movem-se ativamente em direção ao corpo do mesmo (PEREIRA & LABRUNA, 2009). Uma vez no hospedeiro elas procuram um local adequado para se fixar e alimentar, sendo mais comumente encontradas em locais onde a pele é mais delgada (virilha, face interna das pernas, inserção caudal, barbela e pavilhão auricular) regiões onde, coincidentemente, o alcance do animal é mais limitado diminuindo assim as chances de serem removidas mecanicamente pelos hospedeiros através de lambeduras (GUIMARÃES et al., 2001; GONZALES, 2003; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

As larvas se alimentam e média durante 6 a 8 dias e depois mudam para ninfa octopoda que permanece presa no hospedeiro. As ninfas têm, por sua vez, fazem repasto sanguíneo em torno de 7 a 9 dias, e mudam para adultos, machos e fêmeas (PEREIRA & LABRUNA, 2009). Os machos realizam alimentações curtas e repetidas, entre as quais se desprendem e se movem pelo hospedeiro à procura de fêmeas para realização da cópula (ICTTD 2004). Uma vez que as fêmeas copuladas completaram a alimentação, elas se desprendem do hospedeiro e caem no solo e a alimentação das fêmeas lhes permite produzir os ovos que são colocados no ambiente. As fêmeas morrem assim que terminam a oviposição. A fase parasitária total varia de 18 a 30 dias para as fêmeas, enquanto os machos podem permanecer sexualmente ativos no hospedeiro até 70 dias (ICTTD 2004). A duração da fase parasitária é quase independente das condições climáticas, enquanto a fase não-parasitária é influenciada pela temperatura e pela umidade. A oviposição e a

incubação das larvas são aceleradas pelo clima quente, enquanto as temperaturas frias diminuem a velocidade. Se a alimentação sanguínea estiver completa e as condições de temperatura e umidade favoráveis (24-28 °C), 50-60% da massa corporal da fêmea é transformada em até 4.000 ovos, dentre os quais 85 a 95% resultam em larvas (ICTTD, 2004).



Figura 2. Larvas de *Rhipicephalus microplus* no ápice de gramínea, esperando a passagem do hospedeiro. Fonte: arquivo pessoal (Anelise Webster)

1.3 Importância econômica

Rhipicephalus microplus causa grandes perdas à indústria de gado por meio de impactos negativos diretos e indiretos. No Brasil, esse ixodídeo é o ectoparasito mais importante de bovinos e seu impacto econômico na pecuária brasileira foi estimado em 2014 em 3,24 bilhões de dólares americanos por ano, enquanto o país possuía 212 milhões de bovinos. Isso inclui as perdas devido à diminuição da produção de leite e à diminuição do ganho de peso, danos ao couro, mortalidade causada por parasitas transmitidos por essa

espécie de carrapato, bem como os custos de tratamento para controlar as infestações (GRISI et al., 2014).

1.3.1 Impacto direto

Estima-se que haja uma perda de um a três mililitros de sangue por cada carrapato que complete seu ciclo de vida em um animal. Quando eles estão se alimentando em grande número, acarretam anemia e uma série de alterações orgânicas, como anorexia, perda de peso, apatia e em casos mais extremos, pode levar à morte do animal (MARTINS, 2004; JONSSON, 2006; PEREIRA & LABRUNA, 2009). Além disso, a irritação causada pelos carrapatos leva a uma redução da ingestão de alimentos pelo animal e todos esses fatores afetam negativamente o ganho em peso vivo e produção de leite (ICTTD 2004). No Brasil, HORN (1983) estimou que a diminuição do ganho de peso seria de 6 kg / animal / ano. Este parasita pode modificar os parâmetros bioquímicos sanguíneos e digestivos do hospedeiro (CORREIA *et al.*, 1998; GONZÁLES-ACUÑA & GUGLIELMONE, 2006) e também causar alterações na hemostasia durante a infestação de bovinos (RECK *et al.* 2009). *R. microplus* também causa danos ao couro, de modo que manchas aparecem após o processo e reduzam o valor do couro. Finalmente, as infestações de carrapatos predis põem animais a infecções bacterianas e fúngicas (FAO, 1983). Além disso, RECK e colaboradores (2014b) demonstraram que a ocorrência de miíases por *Cochliomyia hominivorax* está diretamente relacionada com a presença de *R. microplus*, onde foi constatado que animais com alta contagem semanal de carrapatos tem quatro vezes mais chances de apresentarem miíases.

1.3.2 Impacto indireto e custos de tratamento

R. microplus é responsável pela disseminação da babesiose e anaplasiose, enfermidades integrantes do complexo Tristeza Parasitaria Bovina (TPB), através da

inoculação dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e da bactéria *Anaplasma marginale*, levando a um quadro de anemia severa, icterícia, febre, prostração, abortos e muitas vezes levando o animal a óbito (MARTINS & CORREA, 1995; JONSSON *et al.*, 2008). O controle de infestação de carrapatos também leva a um aumento considerável dos custos de produção. Isto inclui os custos dos acaricidas, da mão de obra, da manutenção dos banheiros de imersão e dos utensílios utilizados para aplicar os acaricidas (GRISI *et al.*, 2014).

1.4 Controle químico e resistência de *R. microplus*

O controle do carrapato bovino com compostos químicos começou no final do século XIX com o uso de arsênico (ANGUS, 1996). O uso deste composto foi seguido pela utilização de organoclorados (OC) na década de 1940, e alguns anos depois, a resistência a esta classe foi relatada e posteriormente, estes foram substituídos por organofosforados na década de 1950 (GEORGE, 2000). De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN, 2017), atualmente existem seis classes principais de acaricidas químicos comercializadas para controle de carrapatos no Brasil: organofosforados (OF), formamidinas (amitraz), piretróides sintéticos (PS), lactonas macrocíclicas (LM), fenilpirazoles (fipronil) e benzoilfenilureas (fluazuron). A grande escala, o uso intensivo e indiscriminado dos acaricidas associado a uma dose incorreta e nos períodos não favoráveis, ou seja, quando os bovinos apresentam grande carga parasitária, com o objetivo de controlar o carrapato bovino favoreceu a seleção de populações de carrapatos que são resistentes a todos os ingredientes ativos (IA) de acaricidas comerciais disponíveis (RECK *et al.*, 2014a) (Figura 3). Nos últimos anos, tem havido um número crescente de produtos no mercado brasileiro que são misturas de dois ou mais IAs (SINDAN, 2017).

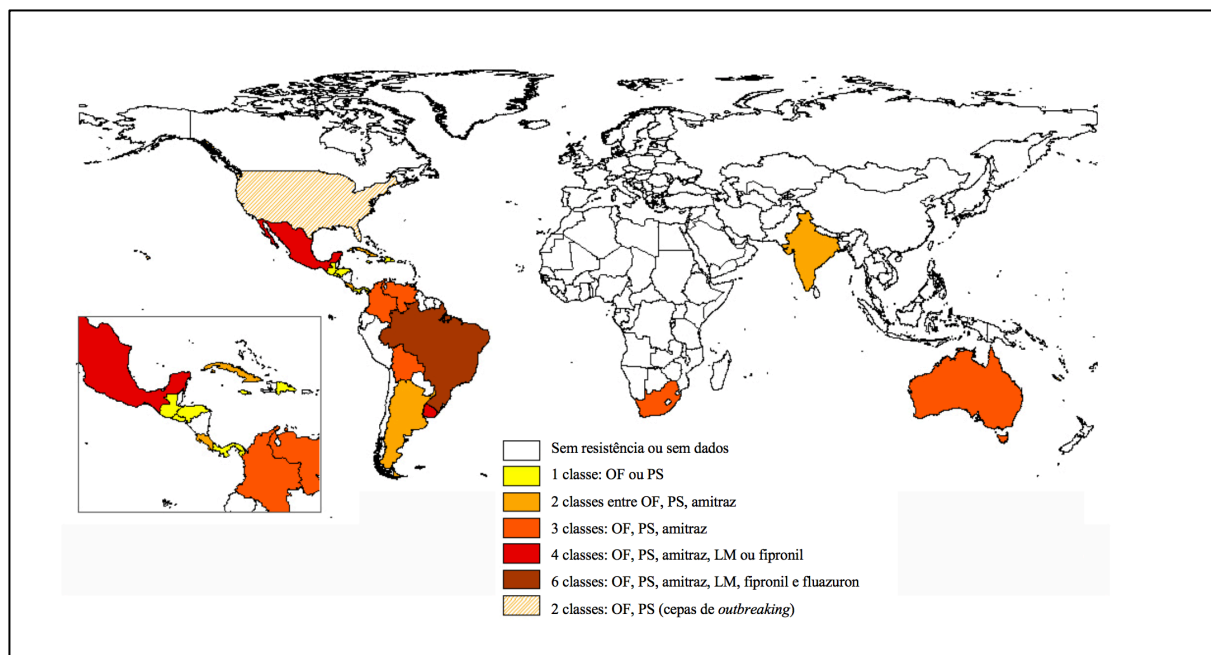


Figura 3: Resistência acumulada a organofosforados (OF), piretróides sintéticos (PS), amitraz, lactonas macrocíclicas (LM), fipronil e fluazuron. O número de classes contra as quais a resistência foi relatada é indicado com um código de cor. A cor indica que há pelo menos um relatório de resistência no país. O mapa não é, portanto, quantitativo. Modificado de LOVIS (2012).

1.4.1 Mecanismos de resistência em *R. microplus*

A resistência pode se manifestar através de vários mecanismos que geralmente são classificados em três categorias principais: insensibilidade ao sítio alvo, desintoxicação metabólica aumentada e penetração cuticular reduzida (GUERRERO et al., 2012). A resistência à penetração é a alteração na capacidade de um acaricida para penetrar no organismo alvo. Embora tenha sido relatado em *R. microplus* para piretróides (SCHNITZERLING et al., 1983), esse mecanismo não foi muito estudado. Em contraste, a insensibilidade ao sítio alvo e a desintoxicação metabólica aumentada são mais comuns e têm sido amplamente estudadas para algumas classes de compostos, como os piretróides sintéticos. A resistência ao sítio alvo é devida à substituição de nucleotídeos no gene que

codifica a molécula alvo de um acaricida, resultando em uma mutação de aminoácidos que confere uma suscetibilidade menor ao composto acaricida (GUERRERO et al., 2012). A resistência metabólica ocorre quando um indivíduo tem uma maior capacidade de desintoxicar ou sequestrar um acaricida. Espera-se que quatro principais famílias de enzimas estejam envolvidas neste tipo de resistência: o citocromo P450, esterases, glutatona S-transferases (LI *et al.*, 2007) e os transportadores ABC (POHL et al., 2012).

1.4.2 Mecanismos de resistência à piretróides

Os piretróides sintéticos foram introduzidos no final da década de 1970 (GRAF et al., 2004) e desde então, são amplamente utilizados, apresentando atividade acaricida eficaz e baixa toxicidade para os mamíferos. No final da década de 1980, a resistência já havia sido observada na Austrália (NOLAN et al., 1989) e na atualidade, a resistência a PS é extremamente comum no Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul (KLAFKE et al., 2017). O canal de sódio dependente de voltagem é o local alvo dos piretróides, resultando em despolarização prolongada e eventual paralisia (VIJVERBERG et al., 1982). Os PS são divididos em dois grupos (Tipos I e II) e ambos atuam no canal de sódio dependente de voltagem do neurônio pré-sináptico, levando a repolarização retardada (TAYLOR 2001). Os mecanismos de resistência à PS estão ligados tanto à resistência baseada no sítio alvo quanto no metabolismo em *R. microplus*. Geralmente, quando ambos os mecanismos coexistem, a insensibilidade do sítio alvo é a mais importante.

Verificou-se que quatro substituições de nucleotídeos únicos no canal de sódio conferem resistência de insensibilidade de sítio alvo a piretróides em *R. microplus*: primeiro, uma mutação localizada no domínio III do gene do canal de sódio, resultando em uma substituição de uma fenilalanina por uma isoleucina foi identificada por HE et al. (1999) nas populações mexicanas de carrapatos. Depois, duas mutações adicionais foram

identificadas no domínio II de populações australianas trocando uma leucina por uma isoleucina e uma glicina por uma a valina (MORGAN et al., 2009, JONSSON et al., 2010). STONE e colaboradores (2014) investigaram a resistência à piretróide em *R. microplus* em cepas do Texas e do México, e identificaram polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) no gene do canal de sódio associados à resistência à piretróide, onde uma citosina é substituída por uma adenina nas cepas resistentes.

Essas quatro mutações estão associadas a diferentes fenótipos de resistência e têm uma distribuição geográfica diferente. A mutação do domínio III, generalizada em todo o México, mas aparentemente limitada a este país, confere uma resistência muito elevada à flumetrina, à cipermetrina e à permetrina, enquanto as duas mutações do Domínio II conferem níveis mais baixos de resistência. A mutação descrita por MORGAN et al. (2009) mostrou proporcionar resistência ao mesmo espectro de acaricida que a mutação do Domínio II e ser generalizada em todo o mundo enquanto a mutação descrita por JONNSON et al. (2010) fornece resistência à flumetrina, mas não à cipermetrina e foi encontrada apenas na Austrália.

Os aspectos moleculares da resistência metabólica à piretróides ainda não estão bem definidos em *R. microplus*. A produção excessiva de uma esterase que hidrolisa a permetrina, denominada CzEst9, foi observada em dois estudos (JAMROZ et al., 2000, PRUETT et al., 2002). Além disso, estudos com a utilização do butóxido de piperonila (pyperonilbutoxide – PBO) indicaram que o grupamento enzimático citocromo P450s também desempenha um papel na resistência a piretróide em algumas cepas (MILLER et al., 1999). Os produtos químicos conhecidos como sinergistas são frequentemente utilizados para detectar a resistência metabólica. O PBO, o fosfato de trifênil (TPP) e o dietilmaleato (DEM) são os três sinergistas mais utilizados e são considerados inibidores

inespecíficos para o citocromo P450, esterases e glutathione S-transferases, respectivamente (GUERRERO et al., 2012). Estudos de sinergistas geralmente são realizados usando o TPL (Teste de Pacote de Larvas), adicionando um sinergista ao produto químico a ser estudado e a resposta ao carrapato é comparada com o produto químico sem sinergista (LI et al., 2008). Uma maior toxicidade de um composto químico na presença de um sinergista é um indicador do provável envolvimento da classe de enzimas correspondente na degradação do composto acaricida (GUERRERO et al., 2012). Estudos de sinergistas são guias úteis para determinar se os mecanismos de resistência metabólica estão presentes.

1.5. Controle biológico e fungos entomopatogênicos

O controle biológico se baseia em um dos fundamentos básicos das relações ecológicas entre os seres vivos, de que cada espécie, animal, vegetal ou microbiana, possui inimigos naturais (SANTI *et al.*, 2011). Dessa forma, organismos capazes de inibir o crescimento populacional de outros podem ser utilizados no controle de populações específicas. Um agente biocontrolador eficiente deve propiciar uma redução significativa dos danos causados por um organismo praga, por morte e redução de seu crescimento populacional (MELO & AZEVEDO, 1998).

Os fungos entomopatogênicos são particularmente adequados para o desenvolvimento como biopesticidas porque, ao contrário das bactérias e vírus que precisam ser ingeridos para causar doenças, os fungos normalmente infectam artrópodes por penetração direta da cutícula, seguida de multiplicação na hemocele (ST.LEGER et al., 2011). Os fungos são patógenos naturais predominantes nas populações de artrópodes e as observações de epizootias entre populações de insetos são comuns, indicando o grande potencial desses microrganismos para a regulação de artrópodes pragas. Estes, têm muitos traços desejáveis que favorecem seu desenvolvimento como agentes de controle biológico.

Eles representam risco mínimo para organismos benéficos não-alvo, como abelhas e minhocas que são essenciais no ecossistema e inimigos naturais de artrópodes, como vespas parasitárias e besouros predatórios (GOETTEL et al., 2001; LACEY et al., 2015). Isso aumenta o seu potencial papel no controle integrado de pragas; a preservação de inimigos naturais lhes permite dar maior contribuição à regulação geral das pragas e a manutenção da biodiversidade é cada vez mais reconhecida como crítica para a produtividade a longo prazo.

Os fungos pertencentes à ordem Hypocreales englobam gêneros importantes de fungos entomopatogênicos, tal como o *Metarhizium anisopliae*, uma espécie anamórfica (ROBERTS & HUMBER, 1981; HUMBER, 2008). No passado, as espécies anamórficas (que produzem apenas esporos assexuados) foram tratadas tradicionalmente como um grupo separado no filo Deuteromycota. No entanto, a partir de investigações com a utilização de ferramentas moleculares apresentou evidências que algumas dessas espécies são associadas a estágios assexuados de Ascomycota (LIU et al., 2001). O gênero *Metarhizium* contém espécies que infectam hospedeiros específicos (por exemplo, *Metarhizium album*, *Metarhizium acridum*), ou hospedeiros variados (por exemplo, *Metarhizium robertsii*, *Metarhizium anisopliae*). Consistente com as suas amplas opções de modo de vida, a maioria das espécies de *Metarhizium* spp. exibe um metabolismo extremamente flexível. Com este metabolismo essas espécies são capazes de crescer sob várias condições ambientais, com nutrientes escassos (RANGEL et al., 2008) e na presença de compostos letais para outros fungos (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI, 2015; ROBERTS & ST.LEGER, 2004).

1.5.1 Modo de ação dos fungos entomopatogênicos no processo de infecção

A infecção de artrópodes por fungos entomopatogênicos é alcançada quando suficientes propágulos infecciosos (geralmente conídios) contatam um hospedeiro

suscetível e as condições são adequadas para que uma micose letal se desenvolva. Os fungos são aplicados para o controle de pragas do solo por incorporação direta de conídios, grânulos miceliais, grânulos inertes ou grânulos nutritivos contendo propágulos fúngicos (conídios ou micélios) (JARONSKI & JACKSON, 2008).

A virulência geralmente diminui com a subcultura de repetição em meios artificiais, e muitas vezes pode ser recuperada através da passagem no hospedeiro (SONG & FENG, 2011, SAFAVI 2011). Os isolados virulentos geralmente expressam uma abundância de proteases ligadas aos esporos, produzem e liberam exoenzimas eficientemente durante a penetração cuticular e geram toxinas à medida que o fungo coloniza o hospedeiro (KHAN et al., 2012). A seleção de isolados que exibem essas características, ou a manipulação de isolados para promover esses traços, tem sido vista como uma forma de superar o que muitas vezes é considerado um impedimento significativo para seu uso mais amplo, ou seja, os fungos matam seus hospedeiros lentamente. A virulência fúngica também pode ser melhorada através de manipulação genética direcionada, por meio da qual genes específicos são inseridos no genoma fúngico para promover a expressão de toxinas que aumentam a virulência dos organismos, por exemplo, a inserção de genes da toxina de escorpião em *Metarhizium* spp. (WANG & ST. LEGER 2007; PENG & XIA 2014).

Os esporos de *Metarhizium* spp. tendem a ser dispersos passivamente, através de correntes de ar, embora a transmissão também possa ocorrer quando insetos suscetíveis entrem em contato com indivíduos infectados, ou os conídios podem ser distribuídos nos corpos de outros artrópodes (VEGA et al., 2009). Os fungos hipocrealeanos podem sobreviver a intervalos repetidos de baixa umidade, recomeçando o desenvolvimento (infecção) quando as condições favoráveis retornam (LACEY et al., 1994). Esses fungos podem, contudo, infectar insetos mesmo em condições de baixa umidade ambiental. A ligação dos conídios em locais de infecção dentro das dobras inter-segmentares onde os

níveis de umidade são elevados pode ser responsável por isso, e o microclima localizado que existe em torno de um artrópode ou na interface artrópode-vegetação pode ter um impacto mais significativo no processo de infecção do que as condições ambientais (VIDAL & FARGUES, 2007; JARONSKI, 2010).

Os fungos podem persistir no solo por vários anos com "escotilhas" de inóculo fornecidas após a infecção bem-sucedida e colonização de um hospedeiro suscetível. Isso leva a concentrações localizadas de conídios infecciosos e maiores oportunidades de infecção de artrópodes (MEYLING & EILENBERG, 2007). A sobrevivência a longo prazo de fungos entomopatogênicos dentro de um ambiente parece depender do acesso a hospedeiros suscetíveis, porém, eles geralmente são considerados saprófitas fracos (ROBERTS & ST. LEGER, 2004). Para as espécies com espectros de hospedeiro relativamente estreitos, a falta de hospedeiros pode limitar sua ocorrência natural e longevidade (MEYLING & EILENBERG, 2007).

1.5.2 *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae (Metschn.) Sorokin é amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado facilmente no solo, onde sobrevive por longos períodos (ALVES, 1998). Apresenta micélio hialino e septado, com conidióforos característicos, dos quais emergem conídios cilíndricos. O desenvolvimento vegetativo desta espécie ocorre normalmente na faixa de temperatura entre 15 e 32°C, sendo a temperatura ideal entre 24 e 30°C e pH ótimo de 6,9 (DRIVER *et al.*, 2000; ARRUDA *et al.*, 2005). Os requisitos nutricionais do fungo são poucos, podendo utilizar como fonte de carbono amido, glicose, glicerol, maltose, sacarose e quitina (ALVES, 1998).

Atualmente, *M. anisopliae* é um importante e amplamente utilizado agente no controle biológico de pragas, tendo sua ação bastante estudada (SHAH & PELL, 2003).

Sua patogenicidade tem sido demonstrada para carrapatos de diferentes gêneros e espécies (KAAYA *et al.*, 1996; ZHIOUA *et al.*, 1997; FRAZZON *et al.*, 2000, BEYS DA SILVA *et al.*, 2012, WEBSTER *et al.*, 2015). *M. anisopliae* já foi descrito como um excelente biocontrolador do carrapato bovino *R. microplus*, determinando elevada mortalidade em ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas (CASTRO *et al.*, 1997; CORREIA *et al.*, 1998; FRAZZON *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 2004, ARRUDA *et al.*, 2005; POLAR *et al.*, 2005; BAHIENSE *et al.*, 2006; WEBSTER *et al.*, 2015).

No Brasil, é utilizado com sucesso, desde 1965 para o controle de *Mahanarva posticata* (cigarrinha-da-cana). Atualmente é utilizado para diversas outras pragas como *Deois flavopicta* (cigarrinha das pastagens), *Cosmopolites sordidus* (broca-da-bananeira), *Diploschema rotundicolle* (broca-dos-citros), *Hypothenemus hampei* (broca-do-café), *Heterotermes* sp. (cupim da cana-de-açúcar) e *Cornitermes cumulans* (cupim das pastagens) (ALVES, 1998). A cada dia surgem cada vez mais produtos formulados a partir dos conídios de *M. anisopliae* para o manejo de pragas em diferentes países inclusive no Brasil (BEYS DA SILVA, 2012).

1.5.3 Processo de infecção

A infecção de artrópodes por *M. anisopliae* envolve uma combinação de dois processos: a pressão mecânica exercida pelo apressório (ST LEGER *et al.*, 1986.) e a degradação da cutícula por enzimas hidrolíticas (Figura 4), tais como lipases (BEYS DA SILVA *et al.*, 2010), proteases (SANTI *et al.*, 2010) e quitinases (DA SILVA *et al.*, 2005, STAATS *et al.*, 2013, JUNGES *et al.*, 2014). O processo de infecção de *M. anisopliae* sobre hospedeiros artrópodes inicia-se com a deposição do conídio sobre o tegumento do hospedeiro, seguido por germinação, penetração, colonização, exteriorização das estruturas do fungo e produção de esporos (Figura 5) (ST LEGER *et al.*, 1991; ARRUDA *et al.*,

2005; BEYS DA SILVA *et al.*, 2012).

Os sintomas causados pela patogenia de *M. anisopliae* sobre o hospedeiro são perda da sensibilidade, da coordenação dos movimentos e paralisia, levando-o à morte (ALVES, 1998). Após a morte do hospedeiro, as hifas invadem órgãos internos e, com o esgotamento de nutrientes, se estendem para fora do tegumento. Sob condições ambientais apropriadas, ocorre a produção de esporos de coloração verde oliva que poderão ser disseminados pelo vento para infectar outros indivíduos. A grande variabilidade genética que apresenta esta espécie resulta no aparecimento de muitas linhagens com diferentes graus de virulência, especificidade, produção de conídios e resistência à luz ultravioleta (ALVES, 1998; ARRUDA *et al.*, 2005).

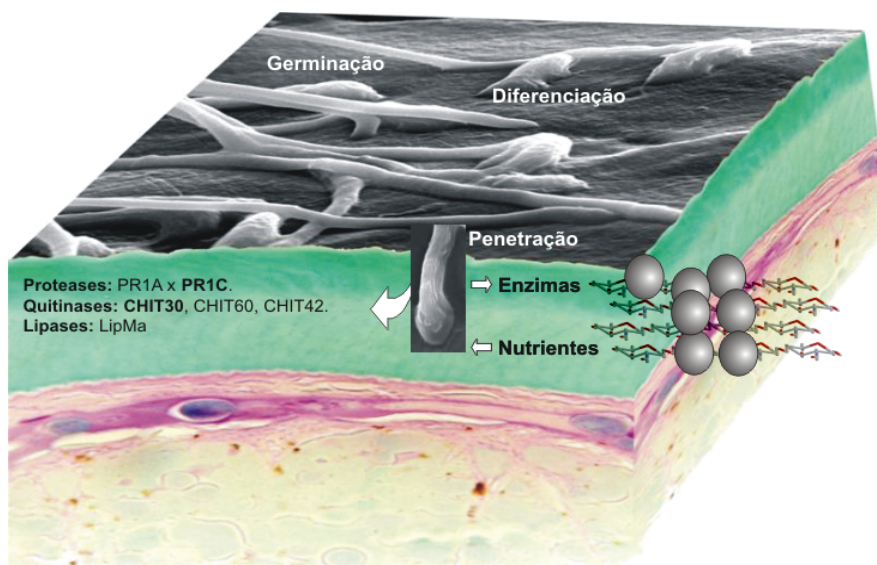


Figura 4: Processo de infecção por *M. anisopliae* através de pressão mecânica exercida pelo apressório e degradação da cutícula pela secreção de enzimas hidrolíticas (Cedida por SCHRANK A.)

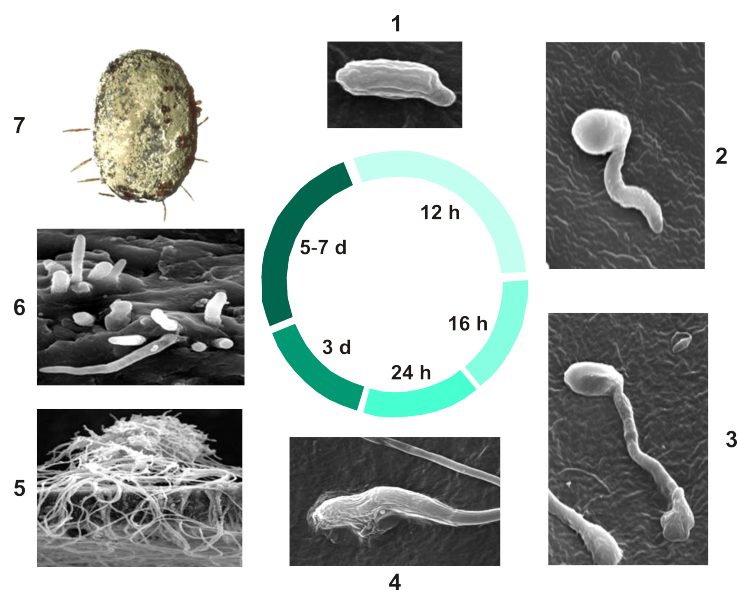


Figura 5: Processo de infecção sobre o carrapato *Rhipicephalus microplus*. (1) Adesão/ Germinação, (2) Tubo germinativo, (3) Apressório, (4) Penetração, (5) Colonização, (6) Emergência (7) Morte do hospedeiro (Cedida por SCHRANK A.)

1.6 Defesa dos artrópodes contra fungos entomopatogênicos

Ao longo de suas vidas, os artrópodes estão rodeados por uma população microbiana heterogênea. Individualmente, a maioria desses microorganismos terá um impacto simétrico infinito sobre a saúde e o bem-estar do artrópode, mas alguns serão simbiotes que ajudam a manter o artrópode vivo, assim como os patogênicos, que os matarão. Apenas uma pequena parcela de microorganismos podem superar com sucesso artrópodes saudáveis. É xiomático que a sobrevivência dos insetos tenha dependido de sua capacidade de interpor barreiras físicas e químicas aos organismos circundantes. A primeira e mais efetiva dessas barreiras é o tegumento cuticular: uma barreira física à infecção composta de macromoléculas, como proteínas curtidas e quitina (St.Leger, 1991; StLeger, Goettel, Roberts e Staples, 1991).

1.6.1 Cutícula como barreira para infecções fúngicas

A cutícula dos artrópodes é uma barreira física à infecção, é composta de macromoléculas, como proteínas curtas e quitina, relativamente resistentes à degradação e que proporciona um ambiente inóspito para microrganismos como baixa atividade na água, uma pequena quantidade de nutrientes prontamente disponíveis e compostos antimicrobianos como ácidos graxos de cadeia curta (ST.LEGER, 1991). A cutícula intacta é inacessível aos organismos que não possuem um mecanismo ativo de penetração de cutícula (por exemplo, protozoários, bactérias e vírus). Esses organismos invadem artrópodes após serem ingeridos com alimentos infectados. No entanto, a penetração direta pela cutícula intacta é o modo de entrada normal realizado pela maioria dos fungos que evoluíram para entomopatogenicidade. Isso decorre, em parte, do fato de que os fungos podem penetrar ativamente e se mover através da cutícula do hospedeiro, violando as barreiras por mecanismos enzimáticos e físicos. A maioria dos fungos são impedidos de ser entomopatógenos porque não possuem um ou mais mecanismos morfológicos ou bioquímicos que degradam a cutícula, ou não desenvolveram formas de superar mecanismos de resistência presentes na cutícula (GAO et al., 2011, HU et al., 2014). Quando a primeira linha de defesa é violada, os microrganismos patogênicos encontram um conjunto de defesas celulares e humorais eficientes, incluindo encapsulamento, melanização, fagocitose, degradação enzimática de agentes patogênicos e peptídeos antimicrobianos (GLIŃSKI & JAROSZ, 2001).

1.6.2 Visão geral dos mecanismos de defesa imune de artrópodes

A imunidade inata está presente em todas as formas de vida multicelulares. Os artrópodes, não possuem a produção de anticorpos que caracteriza a resposta imune adaptativa de vertebrados superiores. O sistema imune inato de artrópodes é capaz de

reconhecimento e subsequente controle da infecção de alguns microrganismos e parasitas através de mecanismos humorais e celulares (LEMAITRE & HOFFMANN, 2007). Os microrganismos invasores são detectados por moléculas de reconhecimento que realizam vigilância e o sinal é transduzido através de duas vias de sinalização primária, denominadas vias Toll e Imd (*immune deficiency*), que regulam as defesas antifúngicas e antibacterianas, respectivamente (VALANNE, WANG & REAMUT, 2011). Na imunidade humoral, os AMP (*antimicrobial peptides*) são produzidos por um tecido especializado, o corpo gorduroso e subsequentemente secretados na hemolinfa. Os AMP de artrópodes são moléculas pequenas, catiônicas, de membrana ativa que se acumulam na hemolinfa, atingindo altas concentrações em resposta à infecção; eles exibem em seu exterior uma gama de atividades contra diferentes classes de agentes patogênicos e ainda podem ser detectados na hemolinfa até várias semanas após o desafio (LEMAITRE & HOFFMANN, 2007).

As respostas imunes celulares envolvem a ação dos hemócitos circulantes, que diferem entre as espécies de artrópodes e são divididas em certas classes com base em características morfológicas, propriedades antigênicas e características funcionais. Seu número aumenta rapidamente durante uma infecção e eles são responsáveis por várias defesas celulares, incluindo disseminação celular, formação de agregados celulares, nodulação, fagocitose e encapsulamento; eles também podem participar de reações humorais (STRAND, 2008). Além disso, os artrópodes podem ativar cascatas proteolíticas complexas que regulam a coagulação e melanização da hemolinfa, defesas associadas à produção de espécies de oxigênio e nitrogênio reativo e respostas epiteliais no intestino que também desempenham papéis importantes na luta contra infecções microbianas (CERENIUS et al., 2010; CHARROUX & ROYET, 2010).

1.6.3 Reconhecimento de fungos pelo sistema imune

A resposta dos artrópodes aos microrganismos invasores é iniciada pelo reconhecimento de certas estruturas microbianas pelos receptores do sistema imune inato do hospedeiro e processos induzidos pelos patógenos que contribuem para a progressão da doença (Figura 6). Em particular, a constatação da infecção microbiana é controlada pelo reconhecimento de moléculas padrões conservadas em microrganismos, como bactérias e fungos (MULLER et al., 2008). Em *Drosophila*, a via de sinalização Toll controla a resposta sistêmica antifúngica do hospedeiro e pode ser ativada por GGBP3 (*Gram negative binding protein 3*) ou pela SPH (*serine protease persephone*). A GGBP3 liga-se ao beta (1,3)-glucano, um componente da parede celular fúngica (MATSKEVICH et al., 2010) e a SPH é ativada por proteases fúngicas (GOTTAR et al., 2006). As famílias de genes de protease são amplamente expandidas em *Metarhizium* sp. em comparação com fungos não entomopatogênicos (GAO et al., 2011); muitos são expressos para penetrar a cutícula do artrópode, mas sua expressão para quando atingem a hemolinfa (FREIMOSER, HU & STLEGER, 2005).

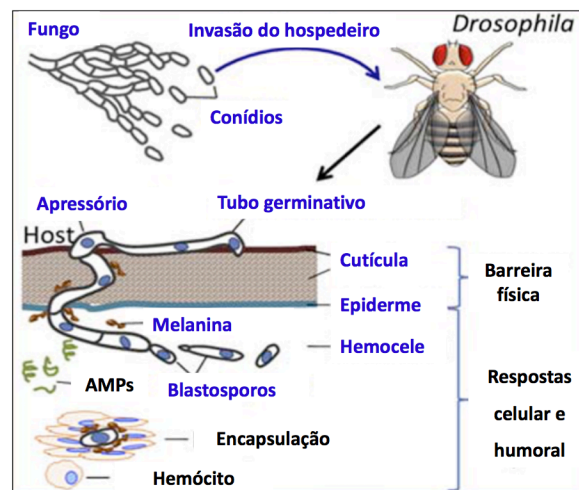


Figura 6: Representação esquemática da imunidade de *Drosophila melanogaster*. A cutícula atua como uma barreira física inicial e primeira linha de defesa em artrópodes (LU & ST LEGER, 2016).

1.6.4. Respostas imunes celulares para fungos

A resposta celular depende de hemócitos presentes na hemocele. Os hemócitos são os fagócitos do sistema imunológico dos artrópodes e são capazes de reconhecer a partícula a ser ingerida e a destruir. A fagocitose envolve reorganização extensiva da membrana, remodelação do citoesqueleto e tráfico de vesículas intracelulares (EVANS & BANERJEE, 2003). Os hemócitos são classificados como pro-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, oenocitóides e coagulócitos. As reações de defesa ocorrem em dois estágios: no primeiro, granulócitos e coagulócitos localizam a partícula estranha e liberam fatores de reconhecimento, e no segundo estágio, estes fatores conduzem os plasmatócitos às lesões ou patógenos (ALVES, 1998). Alterações na composição da hemolinfa dos insetos foram observadas após infecção com bactérias e vírus por FISHER & GANESALINGAM (1970) e com fungos por HUXHAM e colaboradores (1989).

No carrapato *Dermacentor andersoni* foram observados quatro tipos celulares descritos como pro-hemócitos, esferulócitos, plasmatócitos e oenocitóides (BRINTON & BURGDORFER, 1971). Em *R. microplus* inoculados com bactérias para a observação da produção de espécies reativas de oxigênio, foram verificados dois tipos celulares apenas, plasmatócitos e granulócitos, considerando os plasmatócitos as células mais abundantes (PEREIRA et al., 2001). Em *Ornithodoros moubata* desafiados com a inoculação de microesferas de polistirene fluorescente, foram identificados apenas granulócitos, plasmatócitos e pro-hemócitos. Nos ensaios biológicos realizados por DA SILVA e colaboradores (2006) onde fêmeas de *R. microplus* foram inoculadas com *Metarhizium anisopliae* e *Penicillium* sp. foram identificados seis tipos celulares: pro-hemócitos, granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides, sendo os dois últimos, os tipos celulares menos abundantes.

O estudo das características básicas da relação entre o microrganismo e o seu respectivo hospedeiro tem permitido um melhor entendimento do processo de patogenicidade e de suas características específicas (PELL et al., 2001). Segundo ALVES e colaboradores (1998) é possível que ocorra sinergismo entre os produtos químicos e biológicos resultando em aumento da eficácia no tratamento de indivíduos resistentes ou menos suscetíveis aos produtos químicos. Como visto anteriormente, a reação imune do organismo alvo contra fungos entomopatogênicos é composta de duas fases: uma é a defesa do tegumento, e a outra é o sistema imunológico incluindo as reações de defesa humoral e celular (WAGO, 1995). De acordo com HIROMORI & NISHIGAKI (2001) doses subletais de drogas geram estresse nos artrópodes que podem alterar a reação imunitária incluindo os hemócitos e defesa humoral. Estes autores mostraram a possibilidade de um método eficaz de controle usando a associação de fungos entomopatogênicos e inseticidas sintéticos, indicando que a sinergia pode ser causada pela inibição do sistema de defesa humoral do organismo alvo.

Em um trabalho desenvolvido pelo nosso grupo (WEBSTER et al., 2015) foi demonstrada a aplicabilidade do uso de *M. anisopliae* associado ou não com acaricidas químicos em condições de campo, no controle de uma cepa resistente de *R. microplus* a acaricida. A eficácia do tratamento com acaricida foi de 71,1%, do *M. anisopliae* utilizado de forma isolada foi de 56,3% e da combinação de *M. anisopliae* com acaricida foi 97,9%, demonstrando que a utilização da associação tem um efeito aditivo ou de sinergismo no controle do carrapato. No entanto, os estudos de mecanismos de interação do carrapato *R. microplus* com o fungo acaropatogênico *M. anisopliae* na presença e ausência de acaricida são escassos ou inexistentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos moleculares de interação do carrapato *R. microplus* com o fungo acaropatógeno *M. anisopliae* na presença e ausência de acaricida.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a técnica mais sensível para avaliação *in vitro* da atividade de *M. anisopliae* em larvas de *R. microplus*.
- Avaliar a atividade de *M. anisopliae* (cepa TIS-BR03) em diferentes populações de campo de *R. microplus*.
- Determinar o perfil transcricional de *R. microplus* expostos a acaricida químico, *M. anisopliae* e à associação de ambos.

3.1 Comparative study between Larval Packet Test and Larval Immersion Test to assess the effect of *Metarhizium anisopliae* upon *Rhipicephalus microplus* tick larvae.

Neste capítulo apresentamos a análise de resultados comparando duas técnicas de bioensaios utilizadas para avaliar o efeito do fungo acaropatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Estes resultados foram utilizados para determinação dos procedimentos experimentais realizados nos capítulos II e III.

Manuscrito publicado no periódico *Experimental and Applied Acarology* como *Short communication*.

Comparative study between Larval Packet Test and Larval Immersion Test to assess the effect of *Metarhizium anisopliae* on *Rhipicephalus microplus* tick larvae.

Anelise Webster^{1,2*}, Ugo Araújo Souza², João Ricardo Martins², Guilherme Klafke², José Reck², Augusto Schrank¹.

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

²Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS, Brazil

*Address for correspondence: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF). Estrada do Conde, 6000, Eldorado do Sul, 92990-000, RS, Brazil. Phone/Fax number: +55 51 3481-3974. E-mail: anelise.webster@gmail.com

Abstract

Entomopathogenic fungi, such as *Metarhizium anisopliae*, for the control of arthropods, have been studied for more than 20 years. The aim of this study was to determine the best methodology to evaluate the *in vitro* effect of the fungus *M. anisopliae* on *Rhipicephalus microplus* tick larvae. We compared a modified Larval Packet Test (LPT) and a Larval Immersion Test (LIT). For the LPT filter papers were impregnated with 1 mL of *M. anisopliae* suspension in Triton X-100 at 0.02%, in concentrations of 10⁶, 10⁷ and 10⁸ conidia/mL and subsequently folded to include the larval ticks. LIT was performed by immersing the larvae in *M. anisopliae* suspensions for 5 minutes using the same three concentrations described for LPT, then the larvae were placed on filter paper clips. For LPT, the LT₅₀ values obtained were 134.6, 27.2 and 24.8 days for concentrations of 10⁶, 10⁷ and 10⁸ conidia/mL; and the mortality after 21 days was 17.3, 17.6 and 38%

respectively. The LT_{50} values of LIT were 24.5, 20 and 9.2 days with mortality after 21 days of 50.5, 64.7 and 98% for 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia/mL, respectively. For the same conidia concentration, LIT showed a higher mortality in a shorter time interval when compared with LPT. These differences between the methods tested must be taking into account in further screening and effect studies with *M. anisopliae*. The set of results shown here could optimize the protocol used to identify *M. anisopliae* strains pathogenic against *R. microplus*.

Key-words: Ixodidae, fungus, biological control, LPT, LIT, acaripathogenic fungi.

Introduction

The tick *Rhipicephalus microplus* is one of the most important ectoparasites of cattle and is widely distributed in tropical and subtropical areas (Estrada-Peña et al. 2006). The economic losses related to tick parasitism are estimated to be \$3.2 billion U.S. dollars per year in Brazil, mainly due to skin damage, reduction in milk production, decreased weight gain, and acaricide control costs (Grisi et al. 2014). Chemical control has mostly been used for controlling ticks. However, resistance to acaricides has been a serious problem in Brazil and other countries. Acaricide resistance has been confirmed for organophosphates, synthetic pyrethroids, amitraz, ivermectin, fipronil and more recently fluazuron (Reck et al. 2014).

The use of microorganisms for the biological control of arthropods was first proposed in the middle of the 19th century (Schrack and Vainstein 2010) and *Metarhizium anisopliae* is the most studied arthropod-pathogenic fungus and has been tested against insects, ticks, spiders, including several disease vectors (Beys-da-Silva et al. 2013; Santi et al. 2011; Kaaya et al., 2011; Schrack and Vainstein 2010; Kaaya and Mwangi, 1998). The

lethal effects of *M. anisopliae* on *R. microplus* have been evaluated in several *in vitro* studies, using fully engorged females, with promising results (Frazzon et al. 2000; Onofre et al. 2001; Arruda et al. 2005; Leemon and Jonsson 2008; Perinotto et al. 2014). The main disadvantage of testing adult ticks is that the number of engorged females is not always sufficient to obtain reliable results (Jonsson et al. 2007). In this sense, protocols using tick larvae have been developed, mainly to allow the investigation of acaricide effects of chemical drugs. Since just one adult tick female can produce more than 3,000 eggs, protocols using tick larvae allow the use of a great number of individuals tested per treatment, even when a low number of adult ticks was available.

Two techniques have been used to test the susceptibility to chemical acaricides using tick larvae: The Larval Packet Test (LPT) (Stone and Haydock 1962) and the Larval Immersion Test (LIT) (Shaw 1966). In both techniques, the response is evaluated based on the percentage of dead larvae after treatment. The LPT is recommended by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) as the standard method for diagnosis of acaricide resistance. In the present study, we evaluated two methodologies to assess the *in vitro* effect of the fungus *M. anisopliae* on *R. microplus* larvae, comparing a modified Larvae Packet Test (LPT) and a Larvae Immersion Test (LIT).

Materials and methods

Ticks

Ticks of the São Gabriel strain were obtained from cattle at Research Centre “Anacreonte Ávila de Araújo” from the Department of Agriculture of Rio Grande do Sul state, municipality of São Gabriel, Brazil (30° 20' 11" S, 54° 19' 12" W). This tick population has a history of resistance against synthetic pyrethroids, amitraz and macrocyclic lactones (Martins and Furlong 2001). After collection, engorged females of *R. microplus* were transferred to the laboratory, washed with water and maintained at 27±1°C

and 80% humidity for oviposition. A pool of approximately 1,000 eggs from 30 fully engorged females were placed in test tubes sealed with cotton plugs. The treatments of larvae were performed on the 15th day after total larval hatching.

Production of fungal suspensions and bioassays.

Spores of highly pathogenic isolate for ticks of *M. anisopliae* (TIS-BR03) were obtained from the Fungi Collection of the Laboratório de Fungos Filamentosos (UFRGS, Brazil). Suspensions of 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia/mL⁻¹ were prepared in Triton X-100 solution (0.02%, v/v).

Larval packet test (LPT)

The LPT was modified from previously described methods (FAO 2004). The major modification was the absence of trichloroethylene or chloroform and carriers (olive oil) to impregnate the filter paper packet. Briefly, a sample of 1 mL of each concentration (10^6 , 10^7 and 10^8 conidia mL⁻¹) of suspension was applied to a piece of paper filter (7.5 × 8.5 cm) (Whatman No.1). Using a paintbrush, approximately 100 larvae (15 days old) were placed on each filter paper, that was folded and closed with clips forming a packet. The tests were performed in triplicate and the packets containing the larvae were kept at 27 ± 1 °C and $80 \pm 10\%$ relative humidity. Live and dead larvae were counted daily for 21 days (three packets per treatment) for further calculation of the LT₅₀ (Lethal Time for 50% of the population) of each group.

Larval immersion test (LIT)

The LIT was adapted from the protocol used for chemical acaricides (Sabatini et al., 2001). Suspensions of each concentration (10^6 , 10^7 and 10^8 conidia mL⁻¹) were

prepared in 1.5 mL microcentrifuge tubes and then approximately 100 larvae were added to each tube. Control groups were treated with 1 mL of Triton X-100 solution (0.02%, v/v). After addition of larvae, the tube was closed and shaken vigorously for some seconds and then gently for five minutes. The tubes were then opened and the larvae transferred with a paintbrush to dry over a filter paper. Next, the larvae were transferred to a filter paper (8.5 x 7.5 cm) (Whatman No. 1) that was folded and closed with clips forming a packet. The packets were incubated at 27–28°C and $\geq 80\%$ relative humidity. Live and dead larvae were counted daily for 21 days (three packets per treatment) for further calculation of the LT_{50} of each group.

Data analysis

Based on larval mortality for each treatment, median lethal times (LT_{50}) and their 95% confidence intervals (CI95%) were calculated with PoloPlus (LeOra Software 2003). Differences among treatments were considered if CI95% values did not overlap (Robertson et al. 2007). Mean mortality after 21 days and standard errors were subjected to statistical analysis. Statistical significance was analyzed by the Student's t test ($P < 0.05$).

Results

In the present study, we compared LPT and LIT (tests recommended to determine acaricide resistance in ticks), to assess the *in vitro* effect of the fungus *M. anisopliae* on *R. microplus* larvae. Estimated values of LT_{50} for the LPT were 134.6, 27.2 and 24.8 days for concentrations of 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia/mL and for LIT were 24.5, 20 and 9.2 days in the same concentrations (Table 1). The mean mortalities after 21 days for LPT were 17.3, 17.6 and 38% for concentrations of 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia/mL respectively, and for LIT were 50.5, 64.7 and 98%, in the same concentrations (Table 2).

Discussion

Different from the results obtained in our study, which showed a significant difference on the mortality of larvae between LIT and LPT, comparative studies using chemical acaricides indicated that there is correlation between the LIT and LPT (FAO 2004). However, in a study conducted by Castro-Janer and coworkers (2009) to establish LC_{50} and discriminating concentrations for the drug fipronil against *Rhipicephalus microplus*, it was verified that the larval mortality was lower in the LPT than the LIT. In spite of that, the authors concluded that both bioassays can be used for the diagnosis of fipronil resistance in *R. microplus*.

Fungal entomopathogens gain access to the host via cuticle penetration (Vega and Kaya 2012). As a first step, spores need to adhere to the host surface through mucilage and adhesive proteins. Penetration is then achieved both by enzyme secretion and the development of specialized structures (appressoria) that exert mechanical pressure (Wang and St Leger 2007). When the fungus reaches the body cavity of the host, it produces hydrolytic enzymes to assimilate nutrients and toxins with immunosuppressive activity (Pal et al. 2007). If the host fails to clear the infection, the fungus kills the insect and transmission is achieved by sporulation from the corpse. Considering that the fungus needs to be in direct contact with the host to start the infection process, it is reasonable to hypothesize that the higher mortality observed for LIT in our study, could be associated with a greater contact of conidia to the larval body when they are immersed in the LIT solution while in the LPT just some parts of larvae are in contact with the conidia.

Quinelato et al. (2012) evaluated the virulence potential of *M. anisopliae* isolates on *R. microplus* larvae using a methodology described by Fernandes et al. (2011), which consists of injecting 1 mL of conidial suspension into the test tube using a hypodermic syringe with the needle inserted between the cotton plug and wall of the glass tube to wet

the larvae. The larvae stayed immersed for 3 minutes, and the tube was then inverted until the conidial suspension had been absorbed by the cotton plug. They evaluated the percentage of larval mortality by visual estimation through microscopic observation. In our study, we had similar results using the same conidia concentrations using the LPT.

Camargo et al. (2012) used the same methodology described by Quinelato and coworkers (2012) to evaluate the effect of oil-based formulations of *M. anisopliae* on *R. microplus* larvae. Their results showed that the aqueous suspension caused less than 20% larval mortality on the tenth day after treatment, similar results were obtained in our study using LPT in the 10^6 and 10^7 conidia/mL on the 20th day after treatment. Again, it seems that LIT shows the higher mortality. The variation of results using different spore concentrations and protocols demonstrates the importance of the standardization of techniques for the evaluation of the effect of *M. anisopliae* in *R. microplus*.

Luz et al. (2016) exposed eggs of *R. microplus* to *M. anisopliae* either directly with the fungal conidial formulations (water or an oil-in-water emulsion) or on previously fungus-treated filter paper. They observed that no larvae hatched from eggs after direct applications of conidia regardless of the formulation. However, the hatching and survival of larvae from indirectly exposed eggs depended on the formulation and conidial concentration applied. Even considering the differences of tests with eggs and larvae, these results agree with our study findings, showing that direct application of the conidia improves the efficiency of the treatment. Again, it is important to emphasize that the fungus need to be in direct contact with the host to start the infection process. With LIT, the larvae are fully exposed to the fungi which allows a higher infection rate, returning in a faster evaluation of the performance of *M. anisopliae* isolates/ strains against ticks.

Conclusion

The findings show that the LIT results in higher mortality in a shorter time when compared to the LPT using the same fungus strain. It demonstrates that screening tests where the fungus is applied directly on ticks increases the mortality rate. The set of results shown here could be used to optimize the protocols to identify *M. anisopliae* strains pathogenic for *R. microplus* tick.

Acknowledgments

This study was financially supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Arruda W, Lubeck I, Schrank A, Vainstein MH. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. (2005) Exp. Appl. Acarol. 37, 231–244. doi: 10.1007/s10493-005-3818-6
- Beys-da-Silva WO, Santi L, Berger M, Guimarães JA, Schrank A, Vainstein MH. (2013) Susceptibility of *Loxosceles* sp. to the arthropodpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: potential biocontrol of the brown spider. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 7, 59–61. doi: 10.1093/trstmh/trs006
- Camargo MG, Golo PS, Angelo IC, Perinotto WM, Sá FA, Quinelato S, Bittencourt VR. (2012) Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. Vet Parasitol. 188,140-147. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.012

- Castro-Janer E, Rifran L, Piaggio J, Gil A, Miller RJ, Schumaker TT. (2009) *In vitro* tests to establish LC₅₀ and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. *Vet Parasitol.* 162, 120-128. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.02.013
- Estrada-Peña A, García Z, Fragoso SH. (2006) The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. *Exp. Appl. Acarol.* 38, 307–316. doi: 10.1007/s10493-006-7251-2
- Frazzon APG, Da Silva VI, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH. (2000) *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 94, 117–125.
- Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Caçado PHD, León AAP, Pereira JB, Villela HS. (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 23, 150–156.
- Jonsson NN, Miller RJ, Robertson JL. (2007) Critical evaluation of the modified adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. *Vet Parasitol.* 146,307-315. Epub Apr 11. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.02.031
- Kaaya, G.P., Mwangi, E.N. (1998). Control of livestock ticks in Africa: possibilities of biological control using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. In: COONS, L., ROTHSHILD, M. (Eds). *The Second International Conference on Tick-borne Pathogens at the Host-Vector Interface: a Global Perspective*, 1995, August 28-September 1, South Africa. *Proc. and Abstracts*, 1, 5-16.

- Kaaya, G.P., Samish, M., Hedimbi, M., Gindin, G., Glazer, I. (2011). Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. *Exp Appl Acarol* 55, 273-281.
- Leemon DM, Jonsson NN. (2008) Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 40–49. doi: 10.1016/j.jip.2007.07.006
- LeOra Software. (2003) Robertson JL, Preisler HK, Russel RM (Eds.) Polo Plus Probit and Logit Analysis, User's Guide, Berkeley, 36 pp.
- Lovett B, St Leger RJ. (2017) The insect pathogens. *Microbiol Spectrum* 5:FUNK-0001-2016. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0001-2016
- Luz C, D'Alessandro WB, Rodrigues J, Fernandes ÉK. (2016) Efficacy of water- and oil-in-water-formulated *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus sanguineus* eggs. *Parasitol Res.* 115, 143-149. doi: 10.1007/s00436-015-4729-z
- Martins JR, Furlong J. (2001) Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet. Rec.* 149, 64.
- Onofre SB, Miniuk CM, Barros NM, Azevedo JL. (2001) Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1478–1480.
- Pal S, St Leger RJ, Wu LP. (2007) Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem.* 282, 8969-8977. doi: 10.1074/jbc.M605927200
- Perinotto WMS, Angelo IC, Golo PS, Camargo MG, Quinelato S, Santi L, Vainstein MH, Beys-da-Silva WO, Salles CMC, Bittencourt VREP. (2014) *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae). Pr1 activity: biochemical marker of fungal virulence

- in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 24,123–132.
doi: 10.1080/09583157.2013.847903
- Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall’Agnol B, Scheffer R, Souza UA, Corassini VB, Vargas R, Silveira J, Martins JR. (2014) First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet. Parasitol.* 201,128–136. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.01.012
- Robertson, L.J., Russell, R.M., Presler, H.K., Savin, N.E., (2007). *Bioassays with arthropods*. CRC Press, Boca Raton, 199 pp.
- Sabatini GA, Kemp DH, Hughes S, Nari A, Hansen J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. (2001) *Vet Parasitol.* 95, 53-62.
- Santi L, Silva LAD, Beys-da-Silva WO, Corrêa APF, Rangel DEN, Carlini CR, Schrank A, Vainstein MH. (2011) Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 2297–2303. doi: 10.1007/s11274-011-0695-5
- Schrank A, Vainstein MH. (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56, 1267–1274. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.03.008
- Vega FE, Kaya HF. (2012) *Insect pathology*. Academic Press.
- Wang C, St Leger RJ. (2007) The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell.* 6, 808-816. doi: 10.1128/EC.00409-06

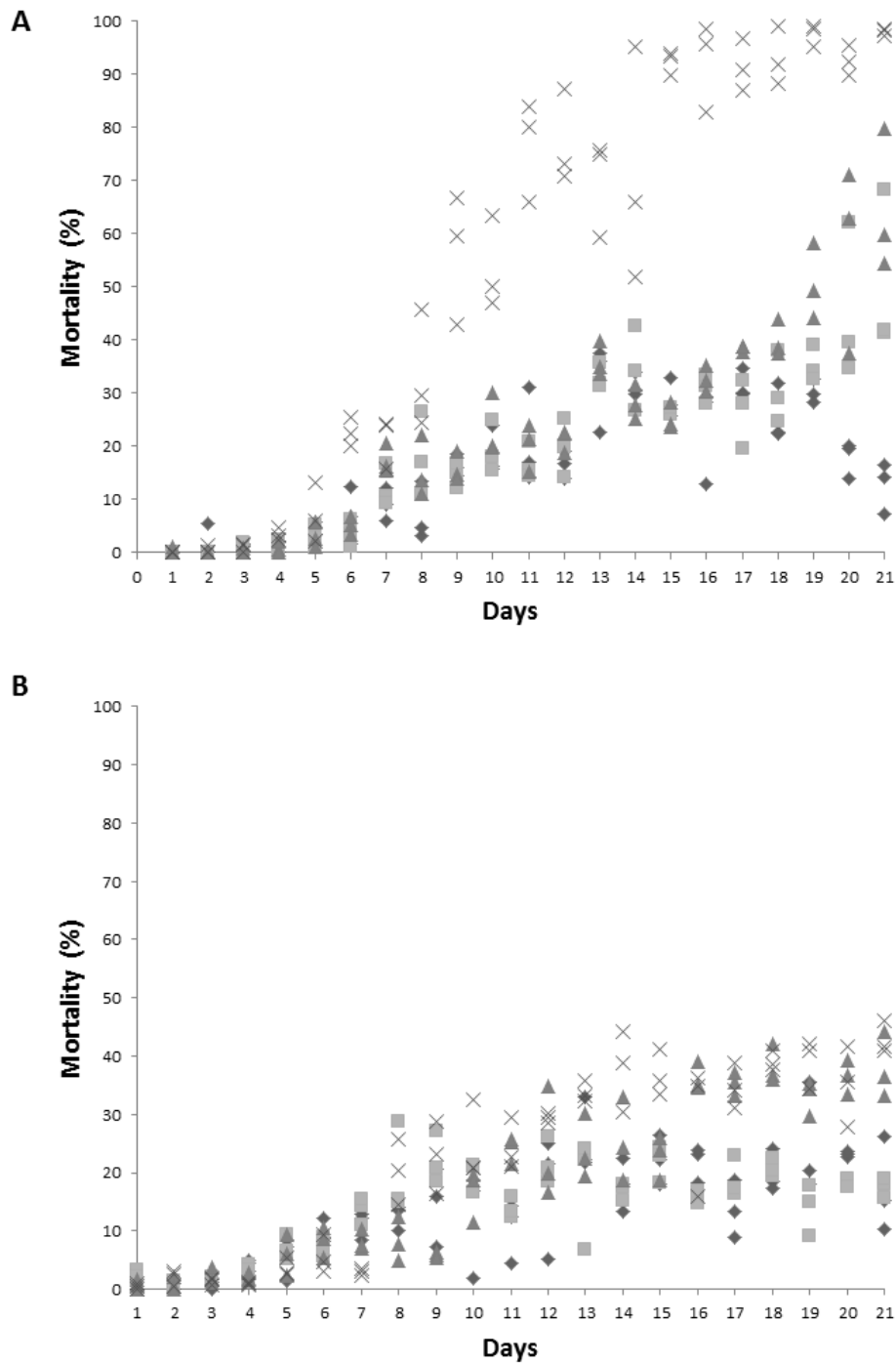
Table 1: Comparison of Larval Packet Test (LPT) and Larval Immersion Test (LIT) to assess the effect of *M. anisopliae* on *R. microplus* tick larvae. Lethal time values for 50% of the tick population (LT_{50}) are expressed in days.

CONCENTRATION (conidia/mL)	LPT	LIT
	LT_{50} (CI 95%)	LT_{50} (CI 95%)
Control	65 (48.7 – 99.2)	39.4 (31.8 – 53.9)
10^6	134.6 (82.8 – 303.4)	24.5 (22.4 – 27.5)
10^7	27.2 (24.3 – 31.3)	20 (17.8 – 23.4)
10^8	24.8 (22.4 – 28.1)	9.2 (8.8 – 9.7)

Table 2: Comparison in mortality rate between the Larval Packet Test (LPT) and Larval Immersion Test (LIT) to assess the effect of *M. anisopliae* on *R. microplus* tick larvae

CONCENTRATION (conidia/mL)	LPT	LIT
	% Mortality after 21 days (±SD)	% Mortality after 21 days (±SD)
Control	17.3 (8.1) a	12.6 (4.9) a
10 ⁶	17.6 (1.8) a	50.5 (15.3) b
10 ⁷	38 (5.7) a	64.7 (13.3) b
10 ⁸	42.9 (2.8) a	98 (0.6) b

Values followed by the same letter in the same line do not differ statistically. Statistical significance was analyzed by the Student's t test ($P < 0.05$).



Supplementary Figure 1: Larval mortality at different concentrations of *Metharhizium anisopliae* suspension. Evaluation (counting the number of alive and dead larvae) was done throughout the experiment (21 days) every day. Spore suspension of *M. anisopliae* 1×10^6 conidia/mL (■), 1×10^7 conidia/mL (▲), 1×10^8 conidia/mL (X) and control (◆).

3.2 Does the effect of *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated?

Neste capítulo apresentamos a variação de suscetibilidade entre as cepas de campo de *Rhipicephalus microplus* quando expostas ao fungo acaropatogênico *Metarhizium anisopliae*.

Manuscrito publicado no periódico *Ticks and Tick-borne Diseases*.

Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated?

Anelise Webster^{1,2}, Endrigo Pradel², Ugo Araújo Souza², João Ricardo Martins², José Reck², Augusto Schrank¹, Guilherme Klafke².

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Eldorado do Sul, RS, Brazil

Corresponding author: Anelise Webster. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, lab. 217. Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 91501-970. Phone: +55 51 3308-6079; Fax: +55 51 3308-7309.

E-mail address: anelise.webster@gmail.com (A. Webster)

ABSTRACT

The filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* is an arthropod pathogen used in the biological control of pests in agriculture and livestock. The effect of the fungus *M. anisopliae* on ticks has been shown in experiments *in vitro*. The aim of the present study was to compare the susceptibility of different field isolates of *Rhipicephalus microplus* to *M. anisopliae*. A total of 67 field isolates were evaluated. *Rhipicephalus microplus* larvae were immersed in an *M. anisopliae* suspension (10^8 conidia/ml) for 5 min. The median lethal times (LT₅₀) ranged from 2.6 to 24.9 days. Mortality observed at the 15th day after treatment ranged from 26.3 to 100% in the tested samples. The effect of *M. anisopliae* on tick isolates was not associated with their susceptibility to any acaricide tested, animal

stocking rate, cattle breed, rotational grazing, cultivated pasture, production system, presence of wet areas or biome. The integration of livestock and agriculture practices in the farm and the frequency of acaricide treatment seem to be associated with tick susceptibility to *M. anisopliae*. These results demonstrated that field populations of *R. microplus* show a high variation in their susceptibility to *M. anisopliae*.

KEYWORDS: Ixodidae, fungus, biological control, acaripathogenic fungi.

Introduction

The cattle tick *Rhipicephalus microplus* is a hematophagous ectoparasite that is present in tropical and subtropical areas (Estrada-Peña et al., 2006). Tick parasitism in livestock causes a reduction in milk production, decreased weight gain, skin damage and acaricide-control costs that generate economic losses of 3.2 billion U.S. dollars per year in Brazil (Grisi et al., 2014). The control of *R. microplus* is based mainly on the use of chemical acaricides, which has contributed to the emerging problem of selection for multiple drug resistant tick populations (Reck et al., 2014).

The effect of the fungus *Metarhizium anisopliae* on ticks has been demonstrated with *in vitro* experiments (Frazzon et al., 2000; Perinotto et al., 2012). The applicability of *M. anisopliae* with or without chemical acaricides in field conditions to control an acaricide-resistant strain of the cattle tick *R. microplus* has been demonstrated (Webster et al., 2015).

Perinotto et al. (2012) evaluated two distinct strains of *R. microplus* and found differences in their susceptibility to *M. anisopliae* infection, suggesting that tests of promising fungal isolates should be conducted with several populations of the same arthropod species before the fungal isolate is recommended as a biological control agent.

Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of *M. anisopliae* (strain TIS-BR03) in different field populations of *R. microplus*.

Materials and methods

Ticks

Tick isolates were collected from beef cattle at 67 ranches located in the North Coast area of Rio Grande do Sul State, Brazil. Property data were obtained from the State Official Veterinary Service with permission of the owners. The geographic data of all the ranches where the ticks were collected are shown in Supplementary [Table 2](#). São Gabriel (SG) and Porto Alegre (POA) strains were used as reference tick strains. Ticks of SG strain were obtained from cattle at the FEPAGRO Experimental Station of São Gabriel, municipality of São Gabriel, RS, Brazil (30°20' S, 54°1' W). This tick population has a history of resistance against synthetic pyrethroids, amitraz and macrocyclic lactones (Martins and Furlong, 2001). The POA strain has been widely used as a susceptible reference tick strain and has been maintained without exposure to acaricides in stall conditions at the Isolation Unit of Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS, Brazil (30°05' S, 51°25' W). After collection, *R. microplus* females were transferred to the laboratory, washed with water and maintained at 27±1 °C and 80% humidity for oviposition. Approximately 1000 eggs were placed in test tubes sealed with cotton plugs. The larvae treatment was performed on the 15th day after total larval hatching.

Production of fungal suspensions and susceptibility bioassays

Conidia of highly pathogenic isolates for ticks of *M. anisopliae* (TIS-BR03) were obtained from the Fungi Collection of Laboratório de Biologia Molecular de Fungos

Filamentosos (UFRGS, Brazil). Conidia were suspended in 30 ml of Triton X-100 solution (0.02%, v/v).

Suspensions of 10^8 conidia ml^{-1} were prepared in 1.5 mL microcentrifuge tubes, and then approximately 100 larvae were added to each tube. Control groups were treated with 1 mL of Triton X-100 solution (0.02%, v/v). After the addition of larvae, the tube was closed and shaken vigorously for a few seconds and then gently for 5 min. The tubes were then opened and the larvae transferred with a paintbrush to a filter paper for drying. After that, larvae were transferred to a paper filter (8.5 x 7.5 cm) that was folded and closed with clips forming a packet. The tests were performed in triplicate and the packets were incubated at 27 to 28 °C and $\geq 80\%$ relative humidity. Larval mortality was recorded at days five, 10 and 15 after treatment.

Acaricide resistance bioassays

To address if there is a relationship between acaricide resistance and susceptibility to *M. anisopliae* in *R. microplus*, the magnitude of tick resistance to different classes of acaricides was verified using larval bioassays. The discriminating doses of acaricides used were: cypermethrin 0.2%, chlorpyrifos 1%, ivermectin 1%, fipronil 0.24% and amitraz 0.03%. For cypermethrin and chlorpyrifos, the Larval Packet Test (LPT) was performed according to procedures established by the FAO (2004). A Larval Immersion Test (LIT) was utilized to evaluate ivermectin and fipronil toxicity, as described by Klafke et al. (2012) and Castro-Janer et al. (2009), respectively. The modified LPT was conducted according to Miller et al. (2002) using amitraz. All of the larval tests were performed simultaneously with the susceptible strain POA. The tests were conducted with technical grade cypermethrin, chlorpyrifos, ivermectin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and fipronil (BASF Chemicals, Paulínia, SP, Brazil). The tests with amitraz were done

using a commercial formulation at 12.5% (Triatox®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brazil).

Data analysis

All data were subjected to statistical analysis. Differences between the control and treated groups were analyzed using probit analysis with Polo-Plus (LeOra Software, 2004). The lethal time for 50% (LT₅₀) and 90% (LT₉₀) of the population, and mortality at the 15th day after treatment and its 95% confidence interval (CI95%), were calculated.

In order to identify potential biotic and abiotic variables associated with tick susceptibility to *M. anisopliae*, the farmers were interviewed using an epidemiological questionnaire to collect information regarding the farm production system and cattle tick control management. This study was approved by the Ethics Committee of IPVDF (approval no. 15/2014). A complete copy of the questionnaire is available to the readers upon request directed to the corresponding author. The association between tick susceptibility to *M. anisopliae* and independent variables (acaricide resistance, frequency of acaricide treatment, animal stocking rate, cattle breed, use of cultivated pasture, use of rotational grazing, predominance of dairy or beef cattle, agriculture and livestock integration, presence of wet areas and biome) was assessed by a univariate analysis using a two-tailed Fisher's exact test. For data analysis, tick susceptibility to *M. anisopliae* was used as a dichotomous variable. Thus, tick isolates were divided into two groups according to their susceptibility to *M. anisopliae*: (i) group 1, low susceptibility (those showing mortality rates <70.7 % at the 15th day after treatment), n = 33; and (ii) group 2, high susceptibility (those showing mortality rates ≥70.7 % at the 15th day after treatment), n = 34. The threshold value for high and low susceptibility to the fungus was established considering the median value of mortality of all tick isolates at the 15th day after treatment.

The odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (CI95%) were also determined. Statistics were performed using SISA-Tables Quantitative Skills software (Simple Interactive Statistical Analysis– SISA, Hilversum, The Netherlands, available online at www.quantitativeskills.com/downloads).

Results

The *in vitro* susceptibility of 67 field isolates of *R. microplus* against *M. anisopliae* was evaluated. There were marked differences in mean lethal time among isolates treated with *M. anisopliae*. The LT_{50} values in field isolates ranged from 2.6 to 24.9 days. The LT_{50} values of all tick samples tested are shown in Figure 1 and Supplementary Table 1 (with confidence intervals). There was no significant difference in the LT_{50} values between both reference strains (acaricide resistant and susceptible strain). The SG and POA strains infected with *M. anisopliae* had LT_{50} values of 6.1 and 6.4 days, respectively. The LT_{90} values of the most and least susceptible isolate to *M. anisopliae* were 6.6 (CI95% of 5.9 to 7.4) and 69.7 (CI95% 46.9 to 136.8) days, respectively. The LT_{90} values of all tick samples tested are shown in Supplementary Table 1. The mortality observed at the 15th day after *M. anisopliae* treatment ranged from 26.3 to 100% in the tested field samples. The reference strains also showed no significant difference in mortality after 15 days of treatment, with 94.1% and 97.2% mortality for SG and POA, respectively (Figure 2). Detailed results of the acaricide resistance profile of these field isolates are beyond the scope of this study and will be presented in a future publication.

The effect of *M. anisopliae* on tick isolates was not associated with their susceptibility to any acaricide tested (amitraz, chlorpyrifos, cypermethrin, fipronil and ivermectin), animal stocking rate, cattle breed, rotational grazing, cultivated pasture, production system (dairy or beef cattle farms), presence of wet areas or biome ($p > 0.05$).

The integration of livestock and agriculture practices on the farm was associated with tick susceptibility to *M. anisopliae* ($p=0.043$). The calculated OR for high susceptibility to *M. anisopliae* in ticks from farms in which there was agriculture and livestock integration was 0.25 (CI95% = 0.07–0.89). Moreover, the frequency of acaricide treatment was also associated with tick susceptibility to *M. anisopliae* ($p=0.011$), since the proportion of tick isolates highly susceptible to the fungus was higher on farms in which more than three acaricide treatments per year were performed. The calculated OR for ticks to be highly susceptible to *M. anisopliae* on farms in which more than three acaricide treatments per year were performed in cattle was 4.17 (CI95% = 1.42 - 12.21). The summary of the analysis of variables potentially associated with tick susceptibility to *M. anisopliae* is shown in Table 1.

Discussion

The effect of the fungus *M. anisopliae* on ticks has been shown with several *in vitro* experiments (Ángel-Sahagún et al., 2010; Frazzon et al., 2000). In a previous field study, the median of treatment efficacy with an acaricide only, *M. anisopliae* only and a combination of *M. anisopliae* with an acaricide were 71.1%, 56.3% and 97.9%, respectively. That study demonstrated that the combination of *M. anisopliae* with commercial acaricides enhances the acaricide and fungal treatment efficacies (Webster et al., 2015). Therefore, the association of a fungus and commercial acaricides could be an effective alternative against multiple acaricide-resistant strains of ticks, since tick populations resistant to all classes of acaricides have already been reported (Reck et al., 2014). In a field study on the efficacy of *M. anisopliae* against *R. microplus*, Camargo et al. (2016) showed that an average efficacy of the oil-based formulation of Metarril was 46.5% compared with the oil control group. It is important to note that differences in the

results of these studies can be attributed both to the effectiveness of the fungal isolate, the formulation of the suspensions or the susceptibility of the tick strain.

In the current study, a remarkable difference in lethal time and mortality between the field isolates of *R. microplus* was shown. In a previous study, Perinotto et al. (2012) analyzed two populations of *R. microplus* treated with *M. anisopliae* at 10^8 conidia mL⁻¹ and obtained LT₉₀ values of 27.5 and 37.3 days for tested populations. At that time, those authors considered that these two tick populations showed a great susceptibility difference. The results of the present study showed that *M. anisopliae* susceptibility differences among field isolates are much more accentuated than previously expected, since the LT₉₀ of the most susceptible population (LP2423) was about 10 times lower than that of the more resistant population (LP2488). This diversity of response must be taken into account in any field study, efficacy test or tick control program based on biological control. It is noteworthy that if/when a commercial formulation of *M. anisopliae* for tick control becomes available, the great diversity of tick isolate responses may significantly affect the results of large-scale use. Moreover, the availability of commercial formulations with different fungal strains could be an alternative, as well as a preliminary investigation of which fungal strains should be used for each region, or even each farm.

Despite the wide variation in average mortality between the strains analysed in our study, even for the most infection-resistant tick population (LP2488, 13% mortality at 10 days after treatment), *M. anisopliae* TIS-BR03 strain showed higher efficacy at 10 days after treatment when compared to 30 *M. anisopliae* strains evaluated by Quinelato et al. (2012). The remarkable virulence of TIS-BR03 against *R. microplus* was clearly shown considering the mean tick mortality ($46.5 \pm 22.5\%$) at 10 days after treatment.

There was a significant association between two variables and susceptibility of tick isolates to *M. anisopliae*. The OR analysis showed that more than three acaricide

treatments in cattle increases the probability that a tick isolate could be highly susceptible to *M. anisopliae* by about four times. It could be hypothesized that several successive tick treatments reduce the genetic variability of the target-population (Coeli et al., 2013; Feyereisen et al., 2015), which may impact microorganism efficacy (Altermatt and Ebert, 2008; King and Lively, 2012). Since a potential synergic effect of *M. anisopliae* and chemical acaricide treatment was previously observed (Webster et al., 2015), it cannot be discarded that the relationship between a high number of acaricide treatments on cattle and the high fungus efficacy observed here could be due to a residual acaricide effect in ticks only observed after exposure to the fungus in the laboratory assays.

On the other hand, integration of livestock and agriculture practices reduces the probability that a tick isolate could be highly susceptible to *M. anisopliae* by approximately 75%. Since it is well known that agriculture practices change the soil and its microbiota, as well as the microenvironment (Manici and Caputo, 2009; Wu et al., 2016; Zhao et al., 2016), it cannot be ruled out that they could also affect the tick population, by driving the selection of phenotypic and genotypic characteristics, and affecting the microbiome and the relationship of ticks with other organisms such as symbionts and pathogens. As acaripathogenic fungi are naturally found in the soil, the possibility of a preliminary contact with ticks cannot be discarded, which could lead to a tolerance of ticks to an acaripathogenic fungal infection (Polar et al., 2005). In this hypothesis, agriculture and soil handling can increase the odds for previous contact between ticks and environmental fungi, such as *M. anisopliae*.

Perinotto et al. (2012) suggested that if a tick population is resistant to chemical acaricides, the mechanisms of acaricide resistance could be related to tick resistance mechanisms to acaripathogenic fungi. They proposed this based on a study that evaluated the effect of *M. anisopliae* on a single *R. microplus* strain resistant to pyrethroids

(Bahiense et al., 2008). They reported that this acaricide-resistant population was less susceptible to fungal treatments when compared to results obtained by (Castro et al., 1997) using the same fungal isolate. The current study showed that there is no correlation between susceptibility to *M. anisopliae* and acaricide resistance.

Conclusion

These results demonstrate that field populations of *R. microplus* show a high variation in their susceptibility to *M. anisopliae*. Based on these findings, tests of fungal isolates should be conducted with the tick populations before the fungal isolate is recommended for use in field control.

Acknowledgments

This study was financially supported by Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAPI), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Altermatt, F., Ebert, D., 2008. Genetic diversity of *Daphnia magna* populations enhances resistance to parasites. *Ecol. Lett.* 11, 918–28. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01203.x
- Ángel-Sahagún, C.A., Lezama-Gutiérrez, R., Molina-Ochoa, J., Pescador-Rubio, A., Skoda, S.R., Cruz-Vázquez, C., Lorenzoni, A.G., Galindo-Velasco, E., Fragoso-Sánchez, H., Foster, J.E., 2010. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic

fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus*=*Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. *Vet. Parasitol.* 170, 278–286.

doi:10.1016/j.vetpar.2010.02.037

Bahiense, T.C., Fernandes, E.K.K., Angelo, I. da C., Perinotto, W.M.S., Bittencourt, V.R.E.P., 2008. Performance of *Metarhizium anisopliae* and Its combination with deltamethrin against a pyrethroid-resistant strain of *Boophilus microplus* in a stall test. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 242–5. doi:10.1196/annals.1428.031

Camargo, M.G., Nogueira, M.R.S., Marciano, A.F., Perinotto, W.M.S., Coutinho-Rodrigues, C.J.B., Scott, F.B., Angelo, I.C., Prata, M.C.A., Bittencourt, V.R.E.P., 2016. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. *Vet. Parasitol.* 223, 38–42. doi:10.1016/j.vetpar.2016.04.014

Castro, A.B.A. de;, Bittencourt, V.R.E.P., Daemon, E., Viegas, E. de C., 1997. Eficácia in vivo do fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado 959) sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. *Rev. da Univ. Rural. Série Ciências da Vida* 19, 73–82.

Castro-Janer, E., Rifran, L., Piaggio, J., Gil, A., Miller, R.J., Schumaker, T.T.S., 2009. In vitro tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. *Vet. Parasitol.* 162, 120–8. doi:10.1016/j.vetpar.2009.02.013

Coeli, R., Baba, E.H., Araujo, N., Coelho, P.M.Z., Oliveira, G., 2013. Praziquantel treatment decreases *Schistosoma mansoni* genetic diversity in experimental infections. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2596. doi:10.1371/journal.pntd.0002596

Estrada-Peña, A., García, Z., Sánchez, H.F., 2006. The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. *Exp. Appl. Acarol.*

38, 307–16. doi:10.1007/s10493-006-7251-2

FAO, 2004. Module 1 – Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention, Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants – Guidelines. Rome.

Feyereisen, R., Dermauw, W., Van Leeuwen, T., 2015. Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 61–77. doi:10.1016/j.pestbp.2015.01.004

Frazzon, A.P., da Silva Vaz Junior, I., Masuda, A., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 94, 117–25.

Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R. de S., Barros, A.T.M. de, Andreotti, R., Cançado, P.H.D., León, A.A.P. de, Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. veterinária = Brazilian J. Vet. Parasitol. Órgão Of. do Colégio Bras. Parasitol. Veterinária* 23, 150–6.

King, K.C., Lively, C.M., 2012. Does genetic diversity limit disease spread in natural host populations? *Heredity (Edinb)*. 109, 199–203. doi:10.1038/hdy.2012.33

Klafke, G.M., Castro-Janer, E., Mendes, M.C., Namindome, A., Schumaker, T.T.S., 2012. Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 184, 212–20. doi:10.1016/j.vetpar.2011.09.018

LeOra Software, 2004. Polo-Plus Probit and Logit Analysis: User's Guide, Berkeley, p. 36.

Manici, L.M., Caputo, F., 2009. Fungal community diversity and soil health in intensive potato cropping systems of the east Po valley, northern Italy. *Ann. Appl. Biol.* 155, 245–258. doi:10.1111/j.1744-7348.2009.00335.x

- Martins, J.R., Furlong, J., 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet. Rec.* 149, 64.
- Miller, R.J., Davey, R.B., George, J.E., 2002. Modification of the food and agriculture organization larval packet test to measure amitraz-susceptibility against ixodidae. *J. Med. Entomol.* 39, 645–51.
- Perinotto, W.M.S., Angelo, I.C., Golo, P.S., Quinelato, S., Camargo, M.G., Sá, F.A., Bittencourt, V.R.E.P., 2012. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. *Exp. Parasitol.* 130, 257–60.
doi:10.1016/j.exppara.2011.12.003
- Polar, P., Kairo, M.T.K., Peterkin, D., Moore, D., Pegram, R., John, S.-A., 2005. Assessment of fungal isolates for development of a myco-acaricide for cattle tick control. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5, 276–84. doi:10.1089/vbz.2005.5.276
- Quinelato, S., Golo, P.S., Perinotto, W.M.S., Sá, F.A., Camargo, M.G., Angelo, I.C., Moraes, A.M.L., Bittencourt, V.R.E.P., 2012. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. *Vet. Parasitol.* 190, 556–565. doi:10.1016/j.vetpar.2012.06.028
- Reck, J., Klafke, G.M., Webster, A., Dall’Agnol, B., Scheffer, R., Souza, U.A., Corassini, V.B., Vargas, R., dos Santos, J.S., de Souza Martins, J.R., 2014. First report of fluzuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet. Parasitol.* 201, 128–136.
- Webster, A., Reck, J., Santi, L., Souza, U.A., Dall’Agnol, B., Klafke, G.M., Beys-da-Silva, W.O., Martins, J.R., Schrank, A., 2015. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Vet. Parasitol.* 207, 302–8. doi:10.1016/j.vetpar.2014.11.021

Wu, L., Chen, J., Wu, H., Wang, J., Wu, Y., Lin, S., Khan, M.U., Zhang, Z., Lin, W.,

2016. Effects of consecutive monoculture of *Pseudostellaria heterophylla* on soil fungal community as determined by pyrosequencing. *Sci. Rep.* 6, 26601.

doi:10.1038/srep26601

Zhao, Y.-P., Lin, S., Chu, L., Gao, J., Azeem, S., Lin, W., 2016. Insight into structure

dynamics of soil microbiota mediated by the richness of replanted *Pseudostellaria*

heterophylla. *Sci. Rep.* 6, 26175. doi:10.1038/srep26175

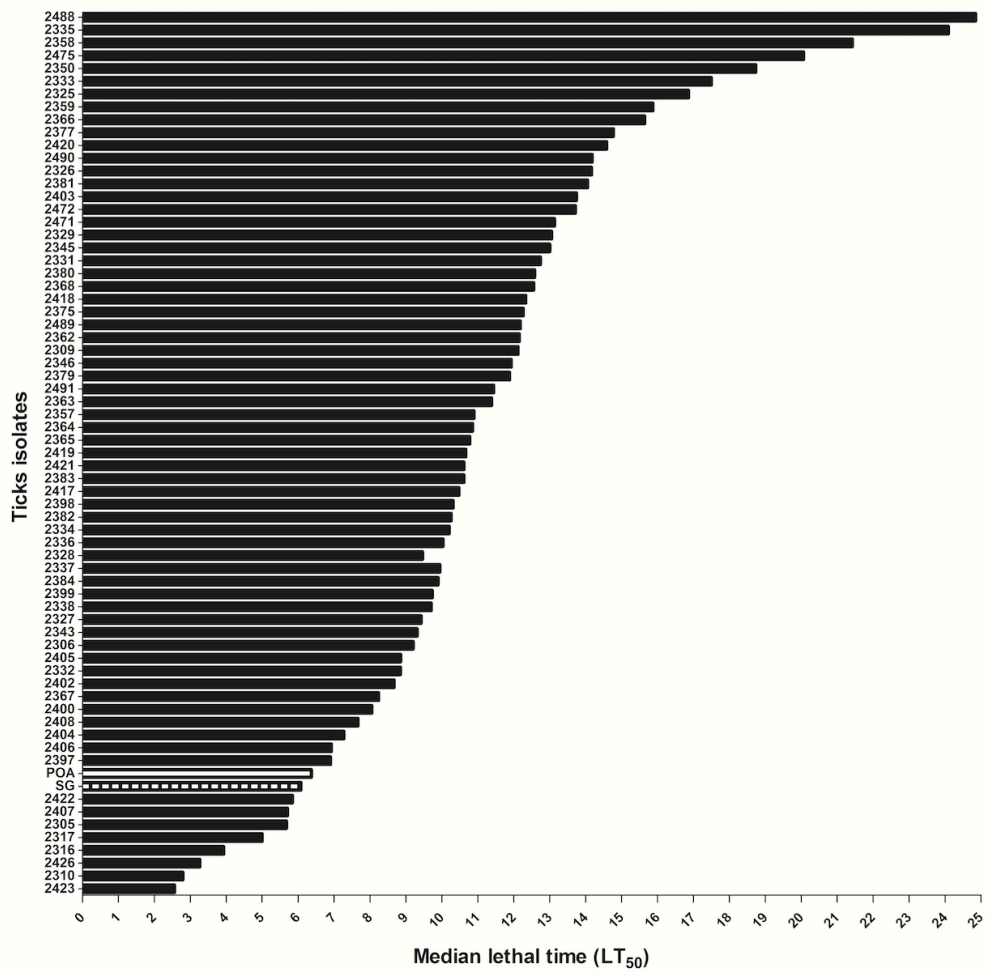


Figure 1. Lethal Time values for 50% of the population (LT₅₀) using *Metarhizium anisopliae* (TIS-BR03) for 67 field populations of *Rhipicephalus microplus* and the reference strains São Gabriel (SG) and Porto Alegre (POA).

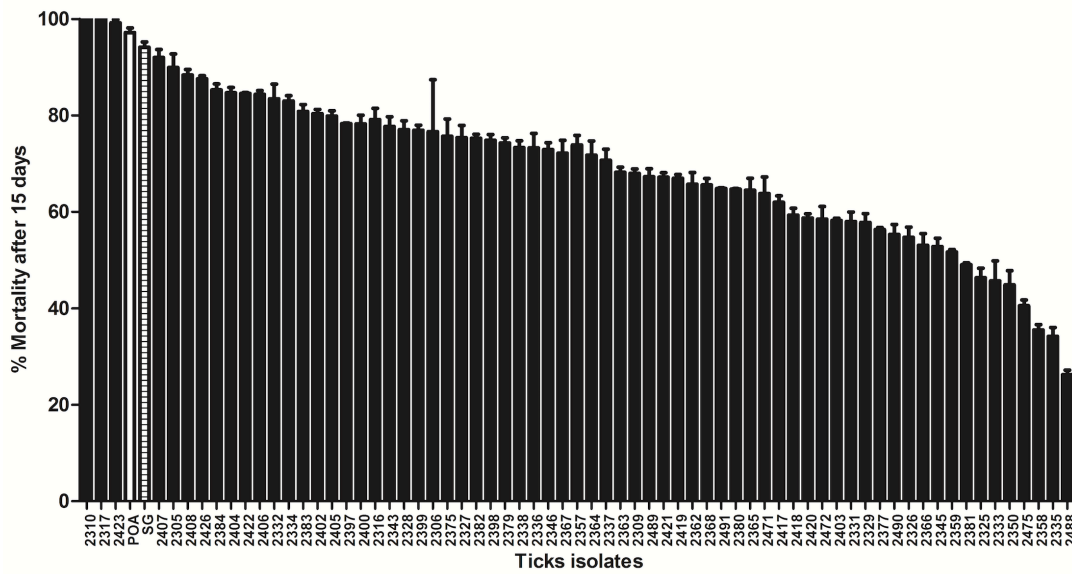


Figure 2. Mortality rate (%) at the 15th day post-infection of 67 field populations and the reference strains São Gabriel (SG) and Porto Alegre (POA) of *Rhipicephalus microplus* larvae exposed to *Metarhizium anisopliae* (TIS-BR03).

Table 1: Summary of results of the association between the susceptibility against *Metarhizium anisopliae* and independent variables.

Property features	Frequency		P value
	High susceptibility	Low susceptibility	
Amitraz			
Susceptible	12/65 (18.46%)	9/65 (13.84%)	0.4339
Resistant	20/65 (30.76%)	24/65 (36.92%)	
Chlorpyrifos			
Susceptible	21/66 (31.81%)	19/66 (28.78%)	0.4589
Resistant	11/66 (16.66%)	15/66 (22.72%)	
Cypermethrin			
Susceptible	1/67 (1.49%)	1/67 (1.49%)	NC
Resistant	32/67 (47.76%)	33/67 (49.25%)	
Fipronil			
Susceptible	20/66 (30.30%)	27/66 (40.29%)	0.1759
Resistant	12/66 (18.18%)	7/66 (10.60%)	
Ivermectin			
Susceptible	24/66 (36.36%)	27/66 (40.90%)	0.7723
Resistant	8/66 (12.12%)	7/66 (10.60%)	
Acaricide treatment			
≤3/year	7/67 (10.44%)	18/67 (26.86%)	0.0112
>3/year	26/67 (38.80%)	16/67 (23.88%)	
Animal stocking rate			
≤1 a.u/ha	8/67 (11.94%)	14/67 (20.89%)	0.1944
>1 a.u/ha	25/67 (37.31%)	20/67 (29.85%)	
Cattle breed			
Taurine	5/67 (7.46%)	8/67 (11.94%)	0.5896
Zebuine	28/67 (41.79%)	26/67 (38.80%)	
Cultivated pasture			
No	28/67 (41.79%)	21/67 (31.34%)	0.0526
Yes	5/67 (7.46%)	13/67 (19.40%)	
Rotational Grazing			
No	24/67 (35.82%)	21/67 (31.34%)	0.4372
Yes	9/67 (13.43%)	13/67 (19.40%)	
Purpose			
Beef cattle	30/67 (44.77%)	34/67 (50.74%)	NC
Dairy cattle	3/67 (4.47%)	0/67 (0%)	
Integrated Crop-Livestock System			
No	29/67 (43.28%)	22/67 (32.83%)	0.0433
Yes	4/67 (5.97%)	12/67 (17.91%)	
Wet areas			
No	13/67 (19.40%)	14/67 (20.89%)	NC
Yes	20/67 (29.85%)	20/67 (29.85%)	

Biome			
Atlantic Rainforest	14/67 (20.89%)	11/67 (16.41%)	0.4545
Pampa	19/67 (28.35%)	23/67 (34.32%)	

NC – not calculated. Two-tailed Fisher’s exact test ($p \leq 0.05$).

Supplementary Table 1: Median lethal time values of distinct field isolates of *R. microplus* exposed to *M. anisopliae*.

Tick isolate	LT ₅₀ (CI95%)	LT ₉₀ (CI95%)
2423	2.56 (1.72 – 3.21)	6.63 (5.90 - 7.44)
2310	2.79 (1.11 – 3.95)	6.96 (5.48 - 8.79)
2426	3.26 (2.13 – 4.17)	18.15 (14.67 - 26.02)
2316	3.93 (1.80 – 5.39)	28.32 (18.52 - 86.44)
2317	5.00 (5.01 – 6.13)	19.87 (16.71 – 23.85)
2305	5.67 (5.02 – 6.22)	14.12 (12.74 - 16.17)
2407	5.70 (5.13 – 6.19)	15.09 (13.49 - 17.49)
2422	5.84 (5.04 – 6.51)	21.38 (18.03 - 27.36)
SG	6.07 (5.01 – 7.62)	11.28 (9.63 – 14.56)
POA	6.36 (5.84 – 7.46)	10.48 (9.57 – 11.80)
2397	6.90 (6.16 – 7.59)	26.38 (21.53 - 35.41)
2406	6.92 (6.37 – 7.43)	17.91 (15.98 - 20.75)
2404	7.27 (6.70 – 7.80)	19.36 (17.16 - 22.64)
2408	7.66 (6.62 – 8.69)	18.81 (15.29 - 26.50)
2400	8.05 (7.46 – 8.64)	21.683 (18.75 - 26.32)
2367	8.24 (6.66 – 9.84)	43.41 (27.15 - 124.22)
2402	8.67 (6.35 – 11.27)	29.55 (18.75 - 125.03)
2332	8.84 (8.29 – 9.38)	16.77 (15.32 - 18.81)
2405	8.85 (8.02 – 9.68)	17.34 (15.17 - 21.00)
2306	9.20 (7.87 – 10.66)	17.50 (14.31 - 25.34)
2343	9.31 (8.50 – 10.10)	18.01 (15.83 - 21.71)
2327	9.42 (8.61 – 10.25)	20.16 (17.48 - 24.69)
2338	9.70 (8.46 – 11.04)	18.71 (15.50 - 26.01)
2399	9.73 (9.06 – 10.42)	18.54 (16.58 - 21.55)
2384	9.89 (8.85 – 11.09)	19.16 (16.09 - 25.33)
2337	9.94 (8.32 – 11.64)	19.56 (15.65 - 31.21)
2328	9.46 (8.39 – 10.60)	17.44 (14.83 - 22.75)
2336	10.03 (8.64 – 11.49)	18.33 (15.19 - 26.13)
2334	10.20 (9.57 – 10.82)	17.63 (16.12 - 19.87)
2382	10.25 (9.72 – 10.83)	20.82 (18.80 - 23.68)
2398	10.31 (9.74 – 10.92)	22.12 (19.85 - 25.37)
2417	10.47 (9.30 – 11.91)	33.31 (25.16 - 53.44)
2383	10.61 (9.11 – 12.47)	21.53 (16.99 - 34.48)
2421	10.61 (9.39 – 12.25)	41.29 (29.33 - 74.55)
2419	10.66 (9.93 – 11.49)	26.94 (22.96 - 33.53)
2365	10.77 (9.57 – 12.30)	31.54 (24.02 - 49.91)
2364	10.85 (8.54 – 14.82)	34.63 (21.59 - 149.18)

2357	10.89 (9.31 – 12.89)	26.37 (19.79 - 48.55)
2363	11.38 (9.10 – 15.15)	36.60 (23.06 - 146.10)
2491	11.44 (10.65 – 12.38)	31.06 (26.18 - 39.08)
2379	11.88 (9.97 – 15.07)	24.99 (18.42 - 51.09)
2346	11.93 (10.41 – 14.10)	24.18 (18.88 - 39.95)
2309	12.12 (10.26 – 15.34)	32.40 (22.40 - 78.17)
2362	12.15 (11.15 – 13.45)	28.67 (23.66 - 37.98)
2489	12.18 (11.61 – 12.81)	23.22 (21.03 - 26.39)
2375	12.26 (11.33 – 13.35)	19.17 (16.83 - 23.96)
2418	12.33 (11.26 – 13.76)	35.35 (28.03 - 49.95)
2368	12.55 (11.88 – 13.34)	24.04 (21.47 - 27.88)
2380	12.58 (11.95 – 13.30)	24.18 (21.65 - 27.97)
2331	12.74 (11.52 – 14.48)	47.34 (34.94 - 76.20)
2345	13.00 (11.43 – 15.52)	36.91 (26.64 - 68.76)
2329	13.05 (12.12 – 14.23)	35.72 (29.38 - 47.11)
2471	13.13 (10.70 – 18.88)	37.96 (24.00 - 123.17)
2472	13.71 (11.58 – 17.97)	61.99 (37.70 - 164.72)
2403	13.74 (12.67 – 15.15)	33.48 (27.84 - 43.18)
2381	14.05 (12.55 – 16.53)	29.70 (23.13 - 46.84)
2326	14.16 (13.12 – 15.54)	34.79 (29.00 - 44.69)
2490	14.18 (13.17 – 15.54)	31.67 (26.74 - 39.95)
2420	14.58 (12.89 – 17.56)	29.63 (22.97 - 46.48)
2377	14.77 (13.09 – 18.30)	24.13 (19.14 - 41.42)
2366	15.64 (13.19 – 20.73)	71.85 (43.42 - 189.01)
2359	15.87 (13.57 – 20.52)	41.22 (28.77 - 83.90)
2325	16.86 (14.75 – 20.42)	62.66 (44.00 - 109.12)
2333	17.49 (14.89 – 23.06)	46.23 (31.77 - 96.30)
2350	18.73 (15.93 – 24.12)	86.44 (54.58 - 190.06)
2475	20.06 (17.22 – 25.26)	71.13 (48.65 - 131.55)
2358	21.42 (18.16 – 27.68)	69.07 (47.11 - 129.91)
2335	24.09 (18.79 – 39.23)	82.82 (47.58 - 263.52)
2488	24.85 (20.53 – 34.00)	69.70 (46.92 - 136.84)

LT: lethal time; CI: confidence interval

Supplementary Table 2: Geographic data of the ranches where the tick isolates were collected in the North Coast area of Rio Grande do Sul State, Brazil.

Tick isolate	Municipality	Latitude	Longitude
2423	Capivari do Sul	50S 30' 10"	30W 05' 42"
2310	Mostardas	51S 04' 11"	31W 08' 01"
2426	Mostardas	50S 57' 13"	31W 10' 21"
2316	Osório	50S 11' 27"	29W 49' 00"
2317	Palmares do Sul	50S 25' 23"	30W 18' 58"
2305	Rolante	50S 34' 42"	29W 40' 49"
2407	Santo Antônio da Patrulha	50S 31' 19"	29W 43' 54"
2422	Capão da Canoa	49S 59' 20"	29W 38' 31"
SG	São Gabriel	30S 20'	54W 15'
POA	Eldorado do Sul	30S 05'	51W 25'
2397	Tramandaí	50S 15' 06"	30W 01' 44"
2406	Santo Antônio da Patrulha	50S 36' 07"	29W 56' 19"
2404	Caraá	50S 22' 12"	29W 48' 20"
2408	Santo Antônio da Patrulha	50S 34' 00"	30W 00' 48"
2400	Tramandaí	50S 15' 06"	30W 01' 44"
2367	Morrinhos do Sul	49S 58' 50"	29W 22' 58"
2402	Caraá	50S 21' 19"	29W 49' 23"
2332	Tavares	51S 08' 13"	31W 13' 50"
2405	Caraá	50S 18' 54"	29W 44' 19"
2306	Rolante	50S 37' 03"	29W 35' 58"
2343	Maquiné	50S 18' 05"	29W 33' 13"
2327	Riozinho	50S 25' 04"	29W 34' 21"
2338	Mostardas	50S 41' 10"	30W 50' 53"
2399	Três Forquilhas	50S 07' 36"	29W 25' 57"
2384	Santo Antônio da Patrulha	50S 34' 07"	29W 51' 25"
2337	Mostardas	50S 56' 31"	31W 01' 34"
2328	Santo Antônio da Patrulha	50S 28' 15"	29W 48' 01"
2336	Mostardas	50S 55' 24"	31W 08' 11"
2334	Tavares	51S 07' 51"	31W 20' 51"
2382	Santo Antônio da Patrulha	50S 37' 17"	29W 42' 17"
2398	Cidreira	50S 22' 51"	30W 00' 12"
2417	Santo Antônio da Patrulha	50S 34' 50"	29W 50' 04"
2383	Santo Antônio da Patrulha	50S 35' 53"	29W 59' 13"
2421	Osório	50S 10' 33"	29W 53' 08"
2419	Maquiné	50S 18' 48"	29W 32' 09"
2365	Três Cachoeiras	49S 55' 58"	29W 24' 24"
2364	Três Cachoeiras	49S 57' 57"	29W 24' 48"
2357	Tavares	51S 08' 12"	31W 14' 30"
2363	Santo Antônio da Patrulha	50S 33' 04"	29W 44' 42"
2491	Três Cachoeiras	49S 52' 16"	29W 25' 01"
2379	Santo Antônio da Patrulha	50S 31' 51"	29W 50' 24"
2346	Capivari do Sul	50S 30' 46"	30W 09' 14"
2309	Mostardas	51S 03' 42"	31W 07' 07"
2362	Mostardas	51S 02' 40"	31W 05' 31"
2489	Mostardas	50S 56' 10"	31W 09' 01"
2375	Arroio do Sal	49S 55' 45"	29W 32' 18"
2418	Santo Antônio da Patrulha	50S 38' 11"	29W 54' 02"

2368	Torres	49S 47' 10"	29W 19' 48"
2380	Santo Antônio da Patrulha	50S 38' 38"	29W 42' 17"
2331	Palmares do Sul	50S 25' 58"	30W 14' 12"
2345	Maquiné	50S 09' 41"	29W 42' 57"
2329	Santo Antônio da Patrulha	50S 37' 18"	29W 59' 58"
2471	Mostardas	50S 36' 36"	30W 44' 31"
2472	Mostardas	50S 56' 59"	31W 10' 05"
2403	Caraá	50S 19' 10"	29W 45' 12"
2381	Santo Antônio da Patrulha	50S 33' 33"	29W 51' 35"
2326	Rolante	50S 30' 18"	29W 38' 29"
2490	Mostardas	50S 48' 18"	30W 58' 32"
2420	Itati	50S 10' 59"	29W 23' 48"
2377	Santo Antônio da Patrulha	50S 34' 16"	29W 58' 37"
2366	Dom Pedro de Alcântara	49S 50' 11"	29W 20' 08"
2359	Tavares	51S 02' 07"	31W 13' 22"
2325	Rolante	50S 37' 57"	29W 41' 30"
2333	Tavares	51S 03' 35"	31W 18' 48"
2350	Santo Antônio da Patrulha	50S 36' 01"	29W 45' 30"
2475	Mostardas	50S 27' 52"	30W 32' 15"
2358	Tavares	51S 04' 54"	31W 14' 41"
2335	Mostardas	50S 46' 45"	30W 57' 02"
2488	Mostardas	50S 49' 50"	30W 59' 58"

3.3 Análise transcriptômica de larvas de *Rhipicephalus microplus* expostas à *Metarhizium anisopliae*, cipermetrina e sua associação.

Neste capítulo apresentamos a comparação dos efeitos observados em nível molecular em *R. microplus* tratado com o fungo acaropatogênico *M. anisopliae*, o acaricida cipermetrina e com a associação de ambos.

3.3 Análise transcriptômica de larvas de *R. microplus* expostas à *M. anisopliae*, cipermetrina e sua associação.

3.3.1 Introdução

Os efeitos de *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Rhipicephalus microplus* já foram avaliados em vários estudos *in vitro* com resultados promissores com relação a taxa de infecção dos carrapatos (FRAZZON et al., 2000; ARRUDA et al., 2005; LEEMON & JONSSON, 2008, PERINOTTO et al., 2014). Mais recentemente, nosso grupo desenvolveu um estudo que demonstrou a aplicabilidade de *M. anisopliae* associado ou não à acaricida, a campo, no controle de uma cepa de *R. microplus* resistente a acaricidas (WEBSTER et al., 2015). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na interação do *R. microplus* com *M. anisopliae* e com os acaricidas permanecem pouco conhecidos.

No presente estudo foi utilizada a técnica de sequenciamento de RNA seq (WANG et al., 2009), uma ferramenta bastante empregada em estudos de transcriptoma, especialmente em trabalhos de resposta a agressão ou infecções por microrganismos (XING et al., 2017; ZHANG et al., 2017). A utilização da ferramenta de RNA seq também foi adotada por ser uma técnica que permite a montagem do transcriptoma sem a necessidade de um genoma de referência. Cabe ressaltar, que apenas recentemente o genoma, em versão *draft* de *R. microplus* foi disponibilizado (BARRERO et al., 2017), no entanto ainda sem anotação dos genes. Desse modo, as análises desta Tese foram realizadas considerando ainda a indisponibilidade de um genoma completo anotado do organismo alvo.

O tamanho do genoma de *R. microplus* foi estimado em 7,1 Gpb e consiste em aproximadamente 70% de DNA repetitivo. Foram identificados 38.827 *loci* de genes putativos de *R. microplus*, dos quais 24.758 foram genes codificadores de proteínas (≥ 100 aminoácidos). A análise comparativa de ontologia gênica contra 11 espécies selecionadas,

incluindo insetos e vertebrados, identificou 10.835 e 3.423 *loci* de genes para proteínas que são exclusivas de *R. microplus* ou comuns entre *R. microplus* e *Ixodes scapularis* (Acari/Ixodidae), respectivamente. Foram identificados *loci* de várias esterases de *R. microplus* com sequência similar à acetilcolinesterase. Além disso, foi relatada a descoberta de um novo citocromo P450 homólogo que mostra estruturas semelhantes à das proteínas CYP41 conhecidas por estarem envolvidas na resistência aos acaricidas (BARRERO et al., 2017).

O entendimento da interação fungo-hospedeiro é de extrema importância para o planejamento da utilização desse microrganismo para o controle estratégico de pragas agropecuárias, como o carrapato bovino. Apesar de diversos estudos já terem sido realizados utilizando *M. anisopliae* para o controle de *R. microplus*, pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos na resposta do carrapato à infecção pelo fungo em nível molecular. Nesse sentido, não há informação sobre os possíveis fenômenos e processos moleculares associados a um possível efeito sinérgico do fungo utilizado em associação com o acaricida. Procurar elucidar os mecanismos que levam a este resultado é essencial para avanços visando o uso integrado destas estratégias.

3.3.2 Materiais e métodos

3.3.2.1 Carrapatos

Os carrapatos da cepa São Gabriel foram obtidos de bovinos no Centro de Pesquisa "Anacreonte Ávila de Araújo" da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAPI) do Estado do Rio Grande do Sul, no município de São Gabriel, Brasil (30° 20 '11 "S, 54° 19' 12" W). Esta população de carrapatos tem um histórico de resistência à piretróides sintéticos, amitraz e lactonas macrocíclicas (MARTINS & FURLONG, 2001). Após a coleta, as fêmeas de *R. microplus* foram enviadas para o laboratório, lavadas com água e

mantidas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e 80% de umidade para oviposição. Aproximadamente 1.000 ovos foram acondicionados em tubos de ensaio tampados com algodão e mantidos a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e 80% de umidade para eclosão das larvas.

3.3.2.2 Produção de suspensões de *M. anisopliae*

Conídios do isolado TIS-BR03 de *M. anisopliae* foram obtidos da Coleção de Fungos do Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos (UFRGS, Brasil). Os conídios foram suspensos em 30 mL de solução Triton X-100 (0,02%, v / v) e foram preparadas suspensões na concentração de 10^8 conídios/mL.

3.3.2.3 Bioensaios

Foram formados quatro grupos experimentais com as larvas de *R. microplus*: 1-grupo controle (sem tratamento); 2-grupo tratado com *M. anisopliae*, 3-grupo tratado com cipermetrina e 4-grupo tratado com a associação de *M. anisopliae* com cipermetrina. Foram utilizadas larvas de *R. microplus* com duas semanas de idade. Foi utilizada a dose discriminatória de cipermetrina (0,2%) (FAO, 2004). Papéis filtro (7,5 x 8,5cm) foram impregnados com 760 μL de acaricida na concentração descrita anteriormente, seguindo o procedimento estabelecido pela FAO (2004). Usando um pincel, aproximadamente 100 larvas foram imersas em microtubos contendo 1 mL de suspensão de *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/mL. O grupo controle foi imerso em 1 mL de solução de Triton X-100 (0,02%, v / v). Após a adição das larvas, o tubo foi fechado e agitado vigorosamente durante alguns segundos e depois suavemente durante 5 min. Os tubos foram então abertos e as larvas transferidas com um pincel para um papel filtro até a secagem. Depois disso, as larvas foram transferidas para um papel filtro (7,5 x 8,5 cm) que foi dobrado e fechado com grampos formando um pacote. Os ensaios foram realizados em

duplicata e os pacotes contendo as larvas foram mantidos a 27 ± 1 °C e 80% de umidade relativa. Larvas vivas após seis dias de infecção foram coletadas e congeladas a -80°C.

3.3.2.4 Extração de RNA

As larvas (duas réplicas biológicas de cada um dos quatro tratamentos) foram submetidas a extração de RNA utilizando Trizol (Invitrogen) seguindo recomendações do fabricante e enviadas para sequenciamento no Centro de Genômica Funcional do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP. Foram realizadas as construções das bibliotecas de RNA e o sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma HiSeq 2.500 (Illumina San Diego, CA, USA).

3.3.2.5 Avaliação e pré-processamento dos dados

Os dados obtidos pelo HiSeq 2500 (Illumina, Inc., San Diego, CA) foram analisados pelo programa Real Time Analysis (fornecido pela Illumina), que faz o *base calling* das imagens do sequenciamento, convertendo-as em sequências no formato fastq, com cada base acompanhada de um escore de qualidade Phred (EWING et al., 1998). Após a conversão para fastq, a avaliação inicial das leituras do sequenciamento foi feita com o programa FastQC versão 0.11.4 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). A filtragem das bases com qualidade baixa foi feita com o programa Trimmomatic versão V0.32 (<http://usadellab.org/cms/>). A retirada das sequências de adaptadores e contaminantes de RNA ribossomal foi realizada com o programa BBDuk, do pacote BBTools versão 36.71 (<http://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Leituras menores que 200 pares de bases após filtragem foram removidas.

3.3.2.6 Montagem *de novo* do transcriptoma de referência de *R. microplus*

As oito amostras (duas réplicas biológicas de cada um dos quatro tratamentos) foram usadas na montagem do transcriptoma de referência utilizando o programa Trinity versão 2.2.0 (GRABHERR et al., 2011) com parâmetros “--normalize_reads” e “--SS_lib_type RF”. O parâmetro “--normalize_reads” indica que a normalização digital do sequenciamento deve ser realizada antes da montagem, a fim de remover leituras redundantes (BROWN et al., 2012). A normalização digital diminui o tempo, memória RAM necessária e espaço em disco usados na montagem, sem afetar negativamente a qualidade. O parâmetro “--SS_lib_type RF” indica a orientação das leituras oriundas do protocolo de preparo das bibliotecas, evitando montagem de transcritos espúrios.

3.3.2.7 Anotação do transcriptoma de referência

Inicialmente, a tradução *in silico* dos transcritos foi realizada utilizando o programa TransDecoder versão 3.0.0 (HAAS et al., 2013), que identifica possíveis regiões codificadoras de proteínas. Os transcritos e os peptídeos preditos foram utilizados para pesquisar sequências homólogas de proteínas. O programa BLASTp do NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi utilizado com um valor $E \leq 1e^{-20}$. O transcriptoma traduzido foi comparado ao banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org>) de proteínas anotadas. Os resultados obtidos no BLASTp foram então carregados no programa Blast2GO versão 3.0 (<https://www.blast2go.com>) e mapeados para os termos de ontologia gênica.

O Blast2GO (3.0) utiliza o programa InterProScan (GOTZ et al., 2008) que busca semelhanças das sequências de aminoácidos com muitos bancos de dados diferentes. As anotações obtidas no InterProScan (FINN et al., 2017) foram então mapeadas para termos de ontologia gênica (GO) de acordo com o Gene Ontology Consortium. O uso dos termos

de GO parte do pressuposto evolutivo que o conhecimento do papel biológico das proteínas compartilhadas em um organismo pode ser frequentemente extrapolado para outros organismos. O objetivo do Gene Ontology Consortium é produzir um vocabulário dinâmico e controlado que possa ser aplicado a eucariotas, mesmo que o conhecimento das funções de genes e proteínas nas células esteja acumulando e mudando. Para este fim, são utilizados diferentes níveis de categorização de ontologias independentes acessíveis na internet (<http://www.geneontology.org>): processo biológico, função molecular e componente celular. O programa GO-Slim foi executado para reduzir a quantidade de termos de GO por transcrição, o que torna o conjunto de dados mais simples, funcional e gerenciável.

3.3.2.8 Quantificação da expressão gênica

A análise do nível comparado de expressão gênica (mRNA) do transcriptoma foi realizada através do mapeamento das sequências brutas sobre a montagem do transcriptoma. As *reads* alinhadas foram então contadas através do programa de Salmon versão 0.8.1 (<http://salmon.readthedocs.io>). O programa Salmon é diferenciado de outros pacotes de software de expressão diferencial, na medida em que não requer um genoma de referência, utilizando os transcritos montados a partir de uma montagem *de novo* para quantificar a expressão gênica (mRNA).

3.3.2.9 Análise de expressão diferencial

Após a obtenção das contagens, de *reads* de transcritos, a análise de expressão diferencial foi realizada com o programa edgeR versão 3.12.0 (ROBINSON et al., 2010). O edgeR foi utilizado pela sua capacidade de avaliar a variabilidade biológica quando há apenas uma ou duas amostras replicadas. Os genes diferencialmente expressos foram detectados com uso de *heatmaps* (ROBINSON et al., 2010). Os transcritos foram

agrupados hierarquicamente permitindo a identificação transcritos biologicamente associados. Os parâmetros para edgeR foram ajustados para um valor $P < 0,05$ (teste - *False Discovery Rate*, FDR) e considerando uma mudança do nível de transcrição de quatro vezes entre qualquer um dos tratamentos. Os resultados obtidos com a aplicação do edgeR foram então carregados no programa Blast2GO versão 3.0 e mapeados para identificação dos termos de ontologia gênica. Para identificar as funções hipotéticas dos genes diferencialmente expressos foi realizada uma comparação de identidade (BLAST) com genes com anotação utilizando o banco de dados do carrapato *Ixodes scapularis*, disponível na Plataforma Vectobase (www.vectorbase.org).

3.3.3. Resultados e discussão

3.3.3.1 Sequenciamento do RNAseq de larvas de *R. microplus*

No presente estudo, utilizamos a tecnologia de RNA-seq para verificar quais genes estão relacionados à resposta de larvas de *R. microplus* durante o processo de infecção por *M. anisopliae*, no tratamento com cipermetrina, um acaricida sintético, e na associação do fungo com o acaricida. Em nossos experimentos anteriores, constatamos que cerca de 50% das larvas de *R. microplus* tratadas com *M. anisopliae* (10^8 conídios/mL) associado à cipermetrina morreram cinco dias após a infecção (dados não mostrados). Assim, selecionamos larvas de seis dias pós-infecção como material para o sequenciamento do RNA. Para obter uma amostra ampla e uma estimativa precisa do transcriptoma de larvas de *R. microplus*, oito bibliotecas de cDNA independentes foram construídas a partir de larvas de *R. microplus* com duas repetições biológicas de um grupo controle e três tratamentos (*M. anisopliae*, cipermetrina e associação de ambos). Todas as oito amostras foram submetidas a RNA-Seq utilizando a plataforma Illumina. Um número total de 259.569.100 sequências dos oito arquivos fastq de dados brutos foram gerados a partir do

sequenciamento (Tabela 1). Antes do passo de montagem *de novo*, as leituras brutas foram analisadas para avaliar métricas de qualidade usando o software FASTQC.

Tabela 1: Número de sequências obtidas do sequenciamento Illumina para cada uma das oito bibliotecas de cDNA construídas a partir de larvas de *R. microplus* expostas a *M. anisopliae*, cipermetrina, associação de ambos e controle (não tratado).

Grupo	Número de sequencias
Controle réplica 1	35.270.219
Controle réplica 2	31.904.007
Cipermetrina réplica 1	28.452.589
Cipermetrina réplica 2	32.151.457
<i>Metarhizium anisopliae</i> réplica 1	35.546.978
<i>Metarhizium anisopliae</i> réplica 2	32.763.908
<i>Metarhizium anisopliae</i> + Cipermetrina réplica 1	32.885.774
<i>Metarhizium anisopliae</i> + Cipermetrina réplica 2	30.594.168
Total	259.569.100

3.3.3.2 RNAseq e montagem *de novo* a partir de RNA extraído de larvas de *R. microplus*

Como não havia sequência disponível do genoma para *R. microplus* para fins de alinhamento, foi desenvolvido um trabalho de bioinformática especializado para montagem de transcriptoma *de novo*. A plataforma Trinity (GRABHERR et al., 2011) gerou um total de 507.792 transcritos com um tamanho total de 303.160.891 pb. O tamanho médio desses transcritos foi de 597,21 pb. O valor de N50 foi de 904 pb. N50 é definido como o comprimento N para o qual 50% de todas as bases na montagem estão em um *contig* de comprimento menor que N (Tabela 2). O programa TransDecoder (HAAS et al., 2013) traduziu um total de 104.323 proteínas totalizando 26.249.966 aminoácidos (aa). O tamanho médio dessas proteínas foi de 252 aa. O valor de N50 foi de 329 aa, e os tamanhos mínimo e máximo da proteína foram 99 e 8.639 aa, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 2: Estatísticas da montagem do RNAseq de larvas de *R. microplus* utilizando a plataforma Trinity.

Parâmetro	Valor
Total de transcritos	507.792
Percentual de GC	47,22
N10	4.478
N20	2.917
N30	1.989
N40	1.358
N50	904
Comprimento médio do transcrito	597,21
Comprimento mínimo do transcrito	201
Comprimento máximo do transcrito	30.053
Mediana do comprimento do transcrito	315
Total de bases montadas	303.260.891

Tabela 3: Estatísticas da codificação de proteínas do RNAseq de larvas de *R. microplus* utilizando o programa TransDecoder.

Parâmetro	Valor
Total de proteínas	104.323
Comprimento médio das proteínas	252
Comprimento mínimo das proteínas	99
Comprimento máximo das proteínas	8.639
Mediana do comprimento das proteínas	156
N50	329
Total de aminoácidos montados	26.249.966

As sequências de proteínas a partir do RNAseq de larvas de *R. microplus* foram analisadas pelo software Blast2GO no qual os resultados do programa InterProScan e a pesquisa no BLASTp foram usados para atribuir a anotação por ontologia gênica (GO – *gene ontology*). A ontologia gênica usa as anotações das sequências homólogas atribuídas às sequências do RNAseq por BLAST e os resultados do programa InterProScan para atribuir os termos GO. O primeiro nível da anotação GO é dividido em três grupos: função molecular, componente celular e processo biológico. Uma vez que uma proteína pode ter múltiplos papéis, também pode ter mais de uma anotação de GO. Para uma compreensão

mais aprofundada dos termos de classificações de ontologia gênica consultar Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>).

Dentro da categoria de função molecular, 12.331 transcritos codificaram proteínas de ligação, seguindo-se a função de atividade catalítica com 10.648 transcritos (Figura 1). As categorias de ligação e catálise podem ser divididas em múltiplas subcategorias: componente de ligação heterocíclica, componente de ligação cíclica orgânica, ligação de íons, atividade de oxiredutase, atividade de transferase, atividade de hidrolase. A função molecular mais prevalente no RNAseq de *R. microplus* foi a ligação de íons com 4.938 sequências (Figura 2). O componente celular teve quatro categorias principais: célula, organela, complexo macromolecular e parte de célula (Figura 3). Os transcritos foram categorizados em subcategorias sendo componente intracelular (28,8%) o mais abundante e organela sem ligação à membrana como o menos abundante (5,9%) (Figura 4). Os termos GO relacionados aos processos biológicos foram: processo celular, processos metabólicos, processo de organismo único, localização e componente celular de organização ou biogênese (Figura 5). A subcategoria mais abundante relacionada ao processo biológico foi processo metabólico celular com 6.619 sequências, seguido de processo de substância orgânica e processo metabólico primário ambos com 5.397 sequências (Figura 6).

Tal como observado nos RNAseq de outras larvas de artrópodes após desafio com LPS (lipopolissacarídeo) ou infecção fúngica (VOGEL et al., 2012; LIU et al., 2014), as categorias de processo biológico GO mais abundantes foram "processos celulares" (32,7%) e "processos metabólicos" (30,7%%). Na categoria de componente celular, "célula" (34,9%) e "parte celular" (34,3%) representaram as subcategorias mais abundantes seguidas de "organela" (21%). Na categoria de função molecular, "ligação" (54%) e "atividades catalíticas" (46%%) foram os mais abundantes.

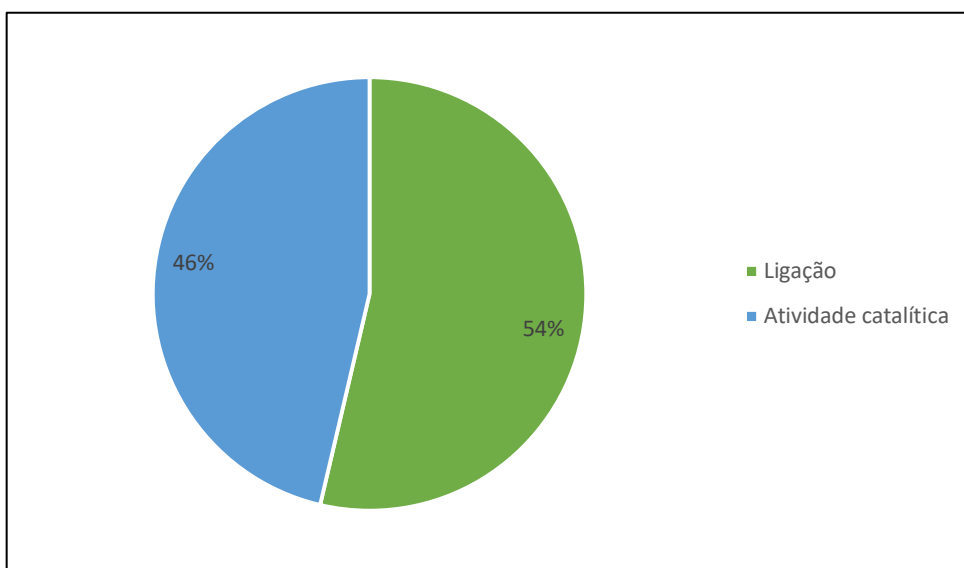


Figura 1: Termos de ontologia gênica (GO) atribuídos aos contigs regulados positivamente em larvas de *Rhipicephalus microplus* na categoria de função molecular.

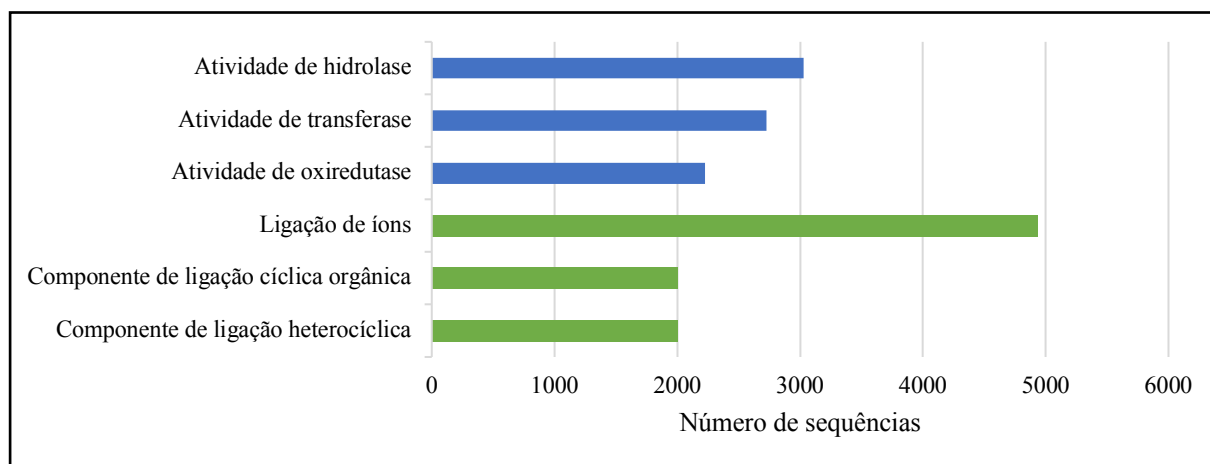


Figura 2: Categorização dos termos de ontologia gênica (GO) atribuídos aos contigs regulados positivamente em larvas de *Rhipicephalus microplus* na categoria de função molecular. As cores das barras indicam os processos relacionados com a figura anterior.

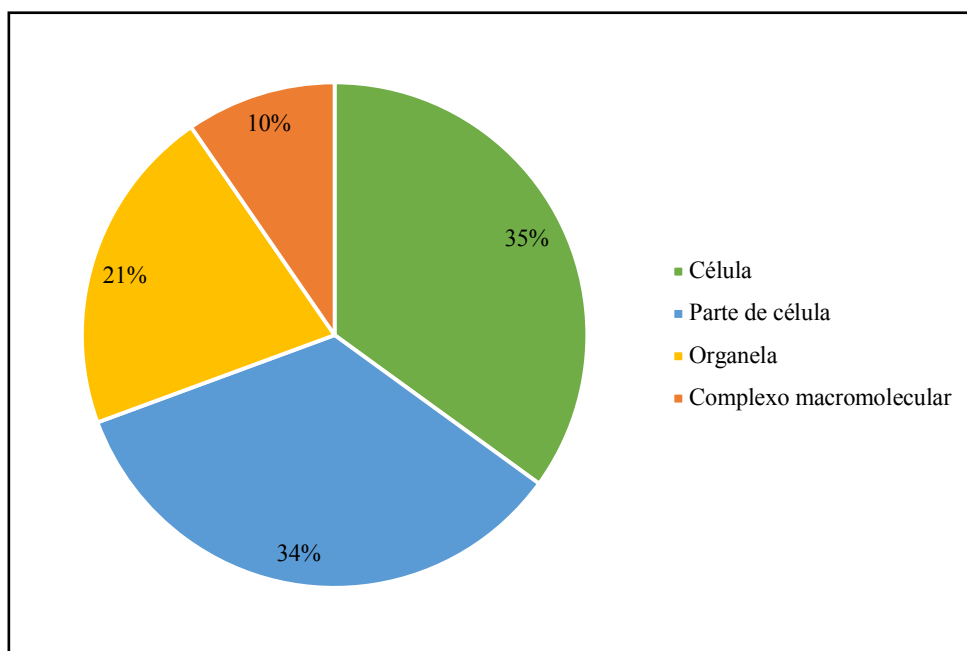


Figura 3: Termos de ontologia gênica (GO) atribuídos aos contigs regulados positivamente em larvas de *Rhipicephalus microplus* na categoria de componente celular.

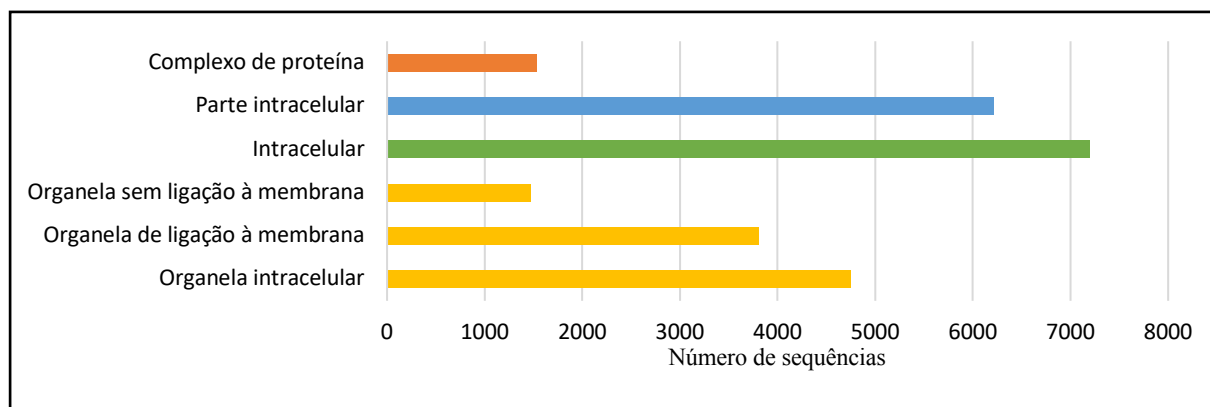


Figura 4: Categorização dos termos de ontologia gênica (GO) atribuídos aos contigs regulados positivamente em larvas de *Rhipicephalus microplus* na categoria de componente celular. As cores das barras indicam os processos relacionados com a figura anterior.

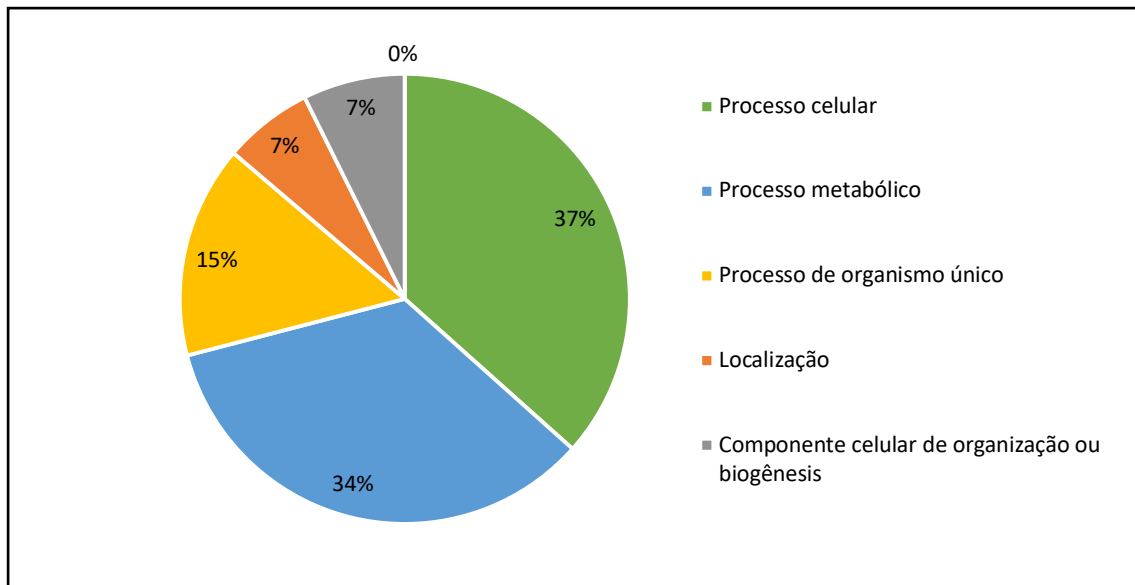


Figura 5: Termos de ontologia gênica (GO) atribuídos aos contigs regulados positivamente em larvas de *Rhipicephalus microplus* na categoria de processo biológico.

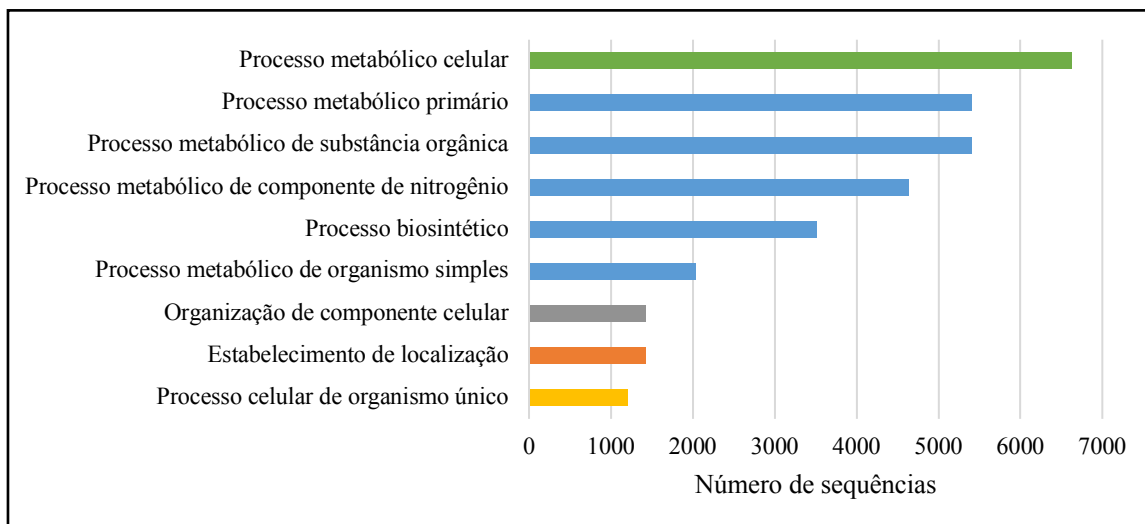


Figura 6: Categorização dos termos de ontologia gênica (GO) atribuídos aos contigs regulados positivamente em larvas de *Rhipicephalus microplus* na categoria de processo biológico. As cores das barras indicam os processos relacionados com a figura anterior.

3.3.3.4 Análise de expressão diferencial

Para avaliar a expressão gênica de larvas de *R. microplus* expostas a *M. anisopliae*, cipermetrina ou associação de ambos, a comparação entre pares foi realizada entre as bibliotecas para determinar os genes diferencialmente expressos. Foram selecionados como genes diferencialmente expressos aquelas sequências que em um determinado tratamento apresentaram alteração dos níveis de transcrição maior que quatro vezes em relação a qualquer outro grupo.

Foram encontrados 31 genes diferencialmente expressos entre o grupo controle e tratado com *M. anisopliae*, 39 entre o grupo controle e cipermetrina, 73 entre o controle e as larvas expostas a *M. anisopliae* + cipermetrina, 81 entre *M. anisopliae* e o grupo da associação *M. anisopliae* + cipermetrina e 46 entre *M. anisopliae* e cipermetrina. A maior diferença foi observada ao comparar o grupo tratado com *M. anisopliae* + cipermetrina com larvas expostas à cipermetrina, totalizando 177 genes diferencialmente expressos (Tabela 4).

Para identificar as funções hipotéticas prováveis das proteínas codificadas diferencialmente expressas foi realizada uma comparação de identidade (BLAST) com genes com anotação utilizando o banco de dados do carrapato *Ixodes scapularis*, disponível na Plataforma Vectobase. Genes com *fold change* menor que quatro e sem anotação ou anotados como proteínas hipotéticas ou desconhecidas não foram selecionados para comparação entre os grupos. Finalmente, foram identificadas 44 sequências de *R. microplus* diferencialmente expressas em algum dos tratamentos e que apresentavam identidade com genes de *I. scapularis* com anotação de função descrita (Tabela 5).

Utilizando as sequências com anotações conhecidas, na comparação entre o grupo controle e os grupos tratados com *M. anisopliae*, cipermetrina e associação de *M. anisopliae* e cipermetrina foram identificados, respectivamente, 13, 2 e 37 genes

superexpressos nos tratamentos. Ainda nesta mesma comparação, foram observados 5, 13 e 2 genes com expressão diminuída nos tratamentos de *M. anisopliae*, cipermetrina e associação com relação ao controle (Figura 7). A comparação entre o grupo tratado com *M. anisopliae* e o grupo tratado com cipermetrina relevou um aumento de expressão em 21 genes no grupo tratado com o fungo e diminuição de expressão em um único gene em relação ao acaricida (dados não mostrados). O grupo tratado com *M. anisopliae* de forma isolada apresentou 5 genes super e 32 genes subexpressos respectivamente, quando comparado com o grupo tratado com a associação (*M. anisopliae* + cipermetrina) (Figura 8). A última comparação foi entre o grupo tratado com cipermetrina em relação ao grupo tratado com a associação (*M. anisopliae* + cipermetrina) que demonstrou 37 genes subexpressos e apenas um gene superexpresso (Figura 8). As Figuras 7 e 8 resumizam sob a forma de desenho esquemático os genes com anotação descrita (considerando o banco de dados de *I. scapularis*) diferencialmente expressos nas larvas de *R. microplus*, bem como a comparação do nível de transcrição destes genes entre os diferentes tratamentos.

Tabela 4 Número de genes diferencialmente expressos de larvas de *R. microplus* tratadas com *M. anisopliae*, cipermetrina, associação de ambos e no controle.

Grupo	Comparativo	Número de genes diferencialmente expressos	Diminuição	Aumento
Controle	<i>M. anisopliae</i>	31	20	11
	Cipermetrina	39	7	32
	<i>M. anisopliae</i> + Cipermetrina	73	61	12
<i>M. anisopliae</i>	Cipermetrina	46	4	42
	<i>M. anisopliae</i> + Cipermetrina	81	62	19
Cipermetrina	<i>M. anisopliae</i> + Cipermetrina	177	25	152

Tabela 5: Percentual de identidade de seqüências diferencialmente expressas de larvas de *R. microplus* tratadas com *M. anisopliae*, cipermetrina e associação de ambos utilizando genes com anotação na base de dados VectorBase.

Nome da seqüência	Descrição	E-value	Id.	Número de acesso
TRINITY_DN177492_c1_g3	Similar to pogo transposable element with KRAB domaincontaining protein	3,00E-13	84.8%	ISCW005955-RA
TRINITY_DN178703_c3_g2	Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	1,00E-15	76.1%	ISCW028386-RA
TRINITY_DN180626_c0_g2	Dual oxidase maturation factor 1 family protein	9,00E-126	77.9%	ISCW021842-RA
TRINITY_DN181333_c0_g1	Fatty acyl-CoA elongase, putative	7,00E-43	85.4%	ISCW017283-RA
TRINITY_DN182151_c0_g1	Spire, putative	2,00E-115	68.7%	ISCW003557-RA
TRINITY_DN184255_c0_g7	Rfx5, putative	7,00E-107	66.2%	ISCW001129-RA
TRINITY_DN184286_c0_g3	Cuticle protein, putative	6,00E-37	74.8%	ISCW009309-RA
TRINITY_DN184842_c0_g2	PWWP domaincontaining protein	2,00E-123	81.8%	ISCW014032-RA
TRINITY_DN187364_c0_g1	Transcription factor basic-helix-loop-helix protein	2,00E-39	80.6%	ISCW024416-RA
TRINITY_DN188040_c1_g2	Phospholipase C delta, putative	2,00E-15	85.1%	ISCW020642-RA
TRINITY_DN188415_c0_g1	Low-density lipoprotein receptor, putative	2,00E-135	81.9%	ISCW016918-RA
TRINITY_DN188555_c0_g1	Sodium/potassium-transporting ATPase, putative	1,00E-104	79.9%	ISCW002223-RA
TRINITY_DN188765_c0_g1	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3, putative	4,00E-85	83.5%	ISCW019703-RA
TRINITY_DN189039_c0_g1	Glutamate carboxypeptidase, putative	8,00E-73	76.9%	ISCW001364-RA
TRINITY_DN189419_c4_g9	Amyloid precursor protein, putative	1,00E-19	88%	ISCW015538-RA
TRINITY_DN189471_c0_g1	Immunoglobulin iset domain-containing protein	2,00E-64	68.9%	ISCW021015-RA
TRINITY_DN189819_c0_g1	Excitatory amino acid transporter, putative	1,00E-35	66.2%	ISCW008266-RA
TRINITY_DN190019_c4_g1	Protein fosB, putative	7,00E-12	81.7%	ISCW010628-RA
TRINITY_DN190077_c0_g2	3 hydroxysteroid dehydrogenase, putative	5,00E-15	70.7%	ISCW007164-RA
TRINITY_DN190311_c0_g4	Ionotropic glutamate receptor, putative	2,00E-78	87.1%	ISCW016543-RA
TRINITY_DN191543_c0_g2	Acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase, putative	5,00E-29	67%	ISCW022255-RA
TRINITY_DN191925_c0_g1	Plasma membrane ca-ATPase B2, putative	0.0	83.8%	ISCW010968-RA
TRINITY_DN192284_c3_g18	Phosphorylase B kinase alpha, kpb1, putative (Fragment)	6,00E-84	76.5%	ISCW002775-RA

TRINITY_DN193070_c0_g1	rRNA processing protein RRP7, putative	2,00E-31	72.4%	ISCW009003-RA
TRINITY_DN193373_c0_g1	Glutamate-gated chloride channel, putative (Fragment)	1,00E-11	67.8%	ISCW022626-RA
TRINITY_DN193557_c0_g4	Microtubule-associated protein tau, putative	6,00E-170	77.2%	ISCW011253-RA
TRINITY_DN193601_c0_g1	Bhlh transcription factor, putative (Fragment)	2,00E-20	81.7%	ISCW024874-RA
TRINITY_DN194017_c1_g1	BAH domaincontaining protein	2,00E-46	79%	ISCW005314-RA
TRINITY_DN194391_c0_g1	Methyltransferase domaincontaining protein	2,00E-179	68.3%	ISCW005564-RA
TRINITY_DN194678_c1_g2	Receptor tyrosine phosphatase type r2a, putative	0.0	80.4%	ISCW020666-RA
TRINITY_DN195084_c1_g1	Secreted mucin MUC17, putative	1,00E-138	83.1%	ISCW000348-RA
TRINITY_DN195222_c0_g1	Potassium channel tetramerisation domain-containing protein, putative	4,00E-170	79.1%	ISCW012989-RA
TRINITY_DN195362_c1_g1	GABA transporter, putative (Fragment)	2,00E-25	69.1%	ISCW017889-RA
TRINITY_DN196150_c1_g1	Secreted protein with Kunitz domain, putative (Fragment)	4,00E-62	90.3%	ISCW024352-RA
TRINITY_DN196369_c0_g1	Low-density lipoprotein receptor, putative	0.0	73.7%	ISCW006333-RA
TRINITY_DN182792_c0_g1	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor, lgr, putative	0.67	91.7%	SCW015788-RA
TRINITY_DN196397_c2_g1	Menin, putative	6,00E-161	78.2%	ISCW004039-RA
TRINITY_DN196410_c2_g3	Lipase member K, putative (Fragment)	3,00E-34	75.5%	ISCW020130-RA
TRINITY_DN196503_c0_g1	Cubilin, putative (Fragment)	3,00E-33	68.5%	ISCW020416-RA
TRINITY_DN196712_c1_g2	Zinc finger protein, putative	2,00E-12	76.2%	ISCW024601-RA
TRINITY_DN196821_c1_g1	Rhomboid, putative	0.0	85.7%	ISCW023071-RA
TRINITY_DN197188_c1_g4	Glutamate transporter, putative	3,00E-107	85.9%	ISCW002184-RA
TRINITY_DN197285_c8_g2	RNA binding protein ELAV, putative	9,00E-70	87%	ISCW010301-RA
TRINITY_DN91189_c0_g1	Beta-carotene dioxygenase, putative	3,00E-30	64.6%	ISCW021870-RA

	Cipermetrina	<i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i> + Cipermetrina
GABA transporter, putative (Fragment)			
Lipase member K, putative (Fragment)			
Dual oxidase maturation factor 1 family protein			
Cuticle protein, putative			
Phospholipase C delta, putative			
Fatty acyl-CoA elongase, putative			
BAH domaincontaining protein			
Methyltransferase domaincontaining protein			
Secreted mucin MUC17, putative			
Potassium channel tetramerisation domain-containing protein, putative			
Secreted protein with Kunitz domain, putative (Fragment)			
Low-density lipoprotein receptor, putative			
Menin, putative			
Cubilin, putative (Fragment)			
Zinc finger protein, putative			
Glutamate transporter, putative			
Glutamate carboxypeptidase, putative			
Microtubule-associated protein tau, putative			
Sodium/potassium-transporting ATPase, putative			
Glutamate-gated chloride channel, putative (Fragment)			
Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor, lgr, putative			
Bhlh transcription factor, putative (Fragment)			
Receptor tyrosine phosphatase type r2a, putative			
PWWP domaincontaining protein			
Eukaryotic large subunit ribosomal RNA			
3 hydroxysteroid dehydrogenase, putative			
Excitatory amino acid transporter, putative			
Phosphorylase B kinase alpha, kpb1, putative (Fragment)			
Similar to pogo transposable element with KRAB domaincontaining protein			
Rhomboid, putative			
Spire, putative			
Rfx5, putative			
Transcription factor basic helix-loop-helix protein			
Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3, putative			
Immunoglobulin iset domain-containing protein			
Protein fosB, putative			
Plasma membrane ca-ATPase B2, putative			
Ionotropic glutamate receptor, putative			
Acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase, putative			
rRNA processing protein RRP7, putative			
RNA binding protein ELAV, putative			
Beta-carotene dioxygenase, putative			
Amyloid precursor protein, putative			

Figura 7: Genes diferencialmente expressos de larvas de *R. microplus* tratadas com *M. anisopliae*, cipermetrina ou associação de ambos em comparação com o grupo controle (não tratado). Em cinza os genes sem alteração; em roxo os genes subexpressos e em amarelo os genes superexpressos em comparação ao controle.

	Cipermetrina	<i>M. anisopliae</i>
Beta-carotene dioxygenase, putative	Amarelo	Amarelo
Excitatory amino acid transporter, putative	Cinza	Amarelo
Phosphorylase B kinase alpha, kpb1, putative (Fragment)	Cinza	Amarelo
Similar to pogo transposable element with KRAB domaincontaining protein	Roxo	Cinza
Fatty acyl-CoA elongase, putative	Roxo	Cinza
Spire, putative	Roxo	Cinza
Rhomboid, putative	Roxo	Amarelo
Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	Roxo	Amarelo
GABA transporter, putative (Fragment)	Roxo	Roxo
Lipase member K, putative (Fragment)	Roxo	Roxo
Dual oxidase maturation factor 1 family protein	Roxo	Roxo
Cuticle protein, putative	Roxo	Roxo
Phospholipase C delta, putative	Roxo	Roxo
BAH domaincontaining protein	Roxo	Roxo
Methyltransferase domaincontaining protein	Roxo	Roxo
Secreted mucin MUC17, putative	Roxo	Roxo
Potassium channel tetramerisation domain-containing protein, putative	Roxo	Roxo
Secreted protein with Kunitz domain, putative (Fragment)	Roxo	Roxo
Low-density lipoprotein receptor, putative	Roxo	Roxo
Menin, putative	Roxo	Roxo
Cubilin, putative (Fragment)	Roxo	Roxo
Zinc finger protein, putative	Roxo	Roxo
Glutamate transporter, putative	Roxo	Roxo
Glutamate carboxypeptidase, putative	Roxo	Roxo
Microtubule-associated protein tau, putative	Roxo	Roxo
Glutamate-gated chloride channel, putative (Fragment)	Roxo	Roxo
Bhlh transcription factor, putative (Fragment)	Roxo	Roxo
Receptor tyrosine phosphatase type r2a, putative	Roxo	Roxo
PWWP domaincontaining protein	Roxo	Roxo
3 hydroxysteroid dehydrogenase, putative	Roxo	Roxo
Rfx5, putative	Roxo	Roxo
Transcription factor basicelix-loop-helix protein	Roxo	Roxo
Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3, putative	Roxo	Roxo
Immunoglobulin iset domain-containing protein	Roxo	Roxo
Protein fosB, putative	Roxo	Roxo
Plasma membrane ca-ATPase B2, putative	Roxo	Roxo
Ionotropic glutamate receptor, putative	Roxo	Roxo
Acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase, putative	Roxo	Roxo
rRNA processing protein RRP7, putative	Roxo	Roxo
RNA binding protein ELAV, putative	Roxo	Roxo

Figura 8: Genes diferencialmente expressos de larvas de *R. microplus* tratadas com cipermetrina ou *M. anisopliae* em comparação com o grupo tratado com associação de ambos (*M. anisopliae* + Cipermetrina). Em cinza os genes sem alteração; em roxo os genes subexpressos e em amarelo os genes superexpressos em comparação à associação *M. anisopliae* + cipermetrina.

3.3.3.5 Papel fisiológico de genes identificados

A seguir, será abordado o papel fisiológico de alguns genes identificados como diferencialmente expressos neste trabalho e seu possível papel no processo desencadeado pelos tratamentos com fungo, acaricidas e sua associação. As proteínas abaixo foram selecionados com base naqueles que apresentaram identidade com sequências de *I. scapularis* com anotação de função conhecida relacionada a resposta à agressão e sistema imune de artrópodes.

3.3.3.5.1 Proteína da cutícula

Para artrópodes, incluindo carrapatos, a cutícula e as membranas peritróficas, são as principais barreiras físicas de proteção (ORIHHEL, 1975). Os fungos entomopatogênicos obtêm acesso ao hospedeiro através da penetração direta da cutícula (VEGA & KAYA, 2012). Como primeiro passo, os esporos aderem à superfície do hospedeiro por meio de proteínas adesivas (WANG & STLEGER, 2007). A penetração é então alcançada tanto pela secreção enzimática quanto pelo desenvolvimento de estruturas especializadas (apressório) que exercem degradação da cutícula e pressão mecânica, respectivamente (SCHRANK & VAINSTEIN, 2010; WANG & STLEGER, 2007). Quando o fungo atinge a cavidade corporal do hospedeiro, produz enzimas hidrolíticas para assimilar nutrientes e toxinas com atividade imunossupressora. Se o hospedeiro não conseguir conter a infecção, o fungo eventualmente mata o artrópode e a transmissão ocorre por esporulação sobre o cadáver (STLEGER & WU, 2007). Os principais componentes da cutícula de artrópodes são a quitina e a proteína da cutícula (MOUSSIAN, 2010). A proteína da cutícula contribui para a resistência ao estresse, resistência à drogas e imunidade dos artrópodes. Em condições ambientais adversas, os genes da proteína da cutícula são induzidos a fortalecer ou estabilizar a estrutura cuticular, resistir aos efeitos dos fatores adversos e garantir a sobrevivência do artrópode (ZHANG et al., 2008). Neste estudo, um gene da proteína da cutícula apresentou superexpressão após a

exposição de larvas de *R. microplus* à associação de *M. anisopliae* e cipermetrina em relação ao controle.

YU e colaboradores (2016) em um estudo de identificação de genes relacionados à imunidade em *Dialeurodes citri* (Hemiptera: Aleyrodidae), infectados com o fungo entomopatogênico *Lecanicillium attenuatum*, observaram que dois genes da proteína da cutícula apresentaram elevação significativa da transcrição após a infecção. Eles analisaram 24 genes que poderiam participar da resposta contra a infecção por *L. attenuatum* e a anotação da função identificou que o gene codificante de uma proteína da cutícula foi que teve o maior valor de regulação positiva. Ao pesquisar o mecanismo de resistência aos inseticidas de *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), SILVA e colaboradores (2012) descobriram que dois genes codificantes de proteínas da cutícula estavam regulados positivamente na presença de inseticida. HE e colaboradores (2007) propuseram que o gene codificante da proteína da cutícula pode desempenhar um papel na cicatrização de feridas em larvas e adultos de *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). Um estudo realizado por ASANO e colaboradores (2013) demonstrou que em larvas de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) submetidas à infecção bacteriana, apresentaram um gene da proteína da cutícula significativamente aumentado.

3.3.3.5.2 3-hidroxiesteróides desidrogenases

A muda, o desenvolvimento e os aspectos da reprodução em artrópodes são controlados pelos hormônios de muda (ecdisteróides) (KOOLMAN, 1989). Os ecdisteróides normalmente são carregados das glândulas que os produzem até o tecido receptor periférico, por proteínas transportadoras plasmáticas (WIGGLESWORTH, 1972). Nos tecidos periféricos a ecdisona é convertida em 20-hidroxiecdisona, composto capaz de ativar as células hipodérmicas, com a restauração da capacidade de crescimento das mesmas e síntese

protéica, permitindo a formação de uma nova cutícula, resultando na liberação da cutícula velha. As 3-hidroxiesteróides desidrogenases reversíveis funcionam como interruptores moleculares no controle da ação do hormônio esteróide, participando de sua síntese e inativação (PENNING et al., 1997). Neste estudo, o gene codificante de uma proteína com atividade hipotética de 3- hydroxysteroid dehydrogenase apresentou superexpressão após a exposição de larvas de *R. microplus* ao fungo *M. anisopliae* e à associação de *M. anisopliae* com cipermetrina. A agressão à cutícula provocada pela ação do fungo parece gerar uma resposta do carrapato que leva ao aumento da expressão de um gene responsável pelo controle de produção do hormônio de modulação do exoesqueleto.

3.3.3.5.3 Elongase

As elongases de ácidos graxos de cadeia muito longa são essenciais na biossíntese de ácidos graxos maiores que C14. Os ácidos graxos são moléculas com uma variedade de funções biológicas, incluindo atuação como fontes de energia e servindo como componentes de lipídios celulares e outras moléculas incluindo hormônios que podem participar em muitos processos biológicos celulares, como reprodução, crescimento, migração, diferenciação e apoptose e são componentes de feromônios em várias espécies de artrópodes. Elongases de ácidos graxos de cadeia muito longa foram isoladas de vários organismos, incluindo leveduras, mamíferos, plantas e outras espécies (LEONARD et al., 2004). Neste estudo, um gene de elongase apresentou superexpressão após a exposição de larvas de *R. microplus* à associação de *M. anisopliae* e cipermetrina. Em *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), o silenciamento de um um gene codificante de uma elongase (*TmELO1*) via RNAi resultou em uma taxa de mortalidade aumentada, indicando que esta elongase é essencial para a sobrevivência desse artrópode (ZHENG et al., 2017). Requisitos semelhantes para elongases na sobrevivência do organismo foram relatados em outras espécies. Por

exemplo, em *Drosophila* sp., RNAi para CG6660, que codifica uma elongase, induziu um fenótipo letal similar ao descrito anteriormente (PARVY et al., 2012).

3.3.3.5.4 Romboides

A proteólise intramembranar, ao longo dos últimos anos, é reconhecida como um importante mecanismo de regulação celular (WEIHOFEN & MARTOGLIO 2003; WOLFE & KOPAN 2004). O gene romboide foi descoberto pela primeira vez em *Drosophila* sp. (MAYER & NUSSLEIN-VOLLEY, 1988). A análise biológica genética e celular revelou que os romboides são serinoproteases intramembranares (URBAN et al., 2001). Em *Drosophila* sp., Rhomboid-1 cliva os precursores do fator de crescimento ligado à membrana, liberando a forma ativa e desencadeando sua seção; portanto, é o principal ativador da sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (LEE et al., 2001). URBAN e colaboradores (2002) demonstraram que uma família de proteases intramembranares de romboide ativa todos os ligantes do fator de crescimento epidérmico (EGF) ligados à membrana de *Drosophila*. Os EGF do receptor de tirosina quinase (RTKs) foram amplamente estudados por seus papéis críticos na sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (MOGHAL & STERNBERG, 1999). Os receptores de tirosina quinase constituem uma grande família de proteínas que funcionam através da cascata de sinalização intracelular RAS / MAPK altamente conservada. Esses receptores são ativados por sinais extracelulares, como fatores de crescimento e controlam processos celulares fundamentais como a proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose (KOLCH, 2000). Em nosso estudo observamos que o grupo tratado com *M. anisopliae* apresentou uma superexpressão do gene romboide o que pode indicar que o tratamento com o fungo leva a uma ativação das rotas de sinalização do carrapato. O oposto foi verificado no grupo tratado com cipermetrina, que apresentou uma

subexpressão deste gene, demonstrando, portanto, que o tratamento com acaricida inibe esta rota de sinalização.

3.3.3.5.5 Proteína secretada com domínio Kunitz

Serinoproteases (SPs) constituem quase um terço de todas as enzimas proteolíticas conhecidas e modulam a bioatividade das proteínas alvo através da clivagem proteolítica (TRIPATHI & SOWDHAMINI, 2008). Quando estas serinoproteases não são mais necessárias, elas são inativadas por inibidores de serinoprotease (ISPs). Muitos ISPs de artrópodes foram purificados do tegumento, do trato genital, da glândula salivar e da hemolinfa. Os ISPs não só desempenham papéis fundamentais na digestão, metamorfose e desenvolvimento, mas também são componentes importantes do sistema imunológico (NA & KANOST, 2010; REICHHART et al., 2011). Os ISPs são nomeados como inibidores da tripsina (ITs), inibidores da quimotripsina (IQ), inibidores de elastase (IEs) e inibidores de subtilisina (ISs) de acordo com suas diferentes proteases alvo inibitórias. Os inibidores de serinoprotease já foram descritos em reações imunes de artrópodes, mediando os processos de coagulação e melanização da hemolinfa e também a produção de peptídeos antimicrobianos (GULLEY et al., 2013). Estes inibidores também podem controlar a proliferação de agentes patogênicos inibindo as proteinases que estes utilizam para colonizar os tecidos do hospedeiro e evadir o sistema imunológico (ARMSTRONG, 2001). A expressão diferencial de inibidores de Kunitz pelo carrapato *Dermacentor variabilis* após infecção com *Rickettsia montanensis*, que é avirulenta foi previamente relatada. Além disso, demonstrou-se que este inibidor tipo Kunitz exibe um efeito bacteriostático contra *R. montanensis* (CERAUL et al., 2008) e que o *knockdown* de seu gene codificante leva a um aumento na susceptibilidade de *D. variabilis* à infecção (CERAUL et al., 2011).

Diversos ISPs de artrópodes foram purificados e suas especificidades inibitórias foram analisadas. RAMESH e colaboradores (1988) descreveram dois inibidores do tipo Kunitz da hemolinfa de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) e descobriram que poderiam inibir serinoproteases incluindo tripsina, quimotripsina e plasmina. Em pesquisas sobre ISPs em *Bombyx mori*, ASO e colaboradores (1994) descreveram que a CI-13 da família Kunitz existe no precursor da ativação de fenoloxidase. HE e colaboradores (2004) descreveram que CI-b1 da família Kunitz se liga ao LPS e localizam bactérias intrusivas através da interação com esses lipopolissacarídeos (LPS). Os inibidores Kunitz podem inibir diretamente as proteases de bactérias e fungos para proteger seus hospedeiros da infecção por agentes patogênicos (EGUCHI et al., 1993, NIRMALA et al., 2001). Em nosso estudo foi observada a superexpressão do gene com domínio Kunitz no grupo de larvas tratadas com a associação *M. anisopliae* com cipermetrina. Este achado pode indicar uma via de resposta a uma agressão, bem como estes inibidores podem estar envolvidos em processos fisiológicos determinantes na sobrevivência do artrópode.

3.3.3.5.6 Mucina

As mucinas são proteínas de ligação a lípidos que constituem uma barreira acelular que promove a proteção do epitélio. Devido a sua estrutura, as mucinas da superfície celular se estendem muito além de outras proteínas, criando os locais de contato celular mais externos (FUKUDA, 2002). As mucinas secretadas participam da formação de grandes agregados extracelulares, quer como componentes da matriz extracelular, como nas secreções mucosas, onde atuam como lubrificantes. Devido ao seu tamanho e localização, as mucinas são frequentemente os primeiros locais de contato para um invasor microbiano (CHALLACOMBE & SWEET, 2002). THEOPOLD e colaboradores (2001) sugeriram que certas proteínas são expressas tanto em tecidos imunes quanto em glândulas secretoras. Uma

dessas proteínas é a hemomucina, uma mucina de superfície celular que foi isolada pela primeira vez de uma linhagem de células de hemócito de *Drosophila* sp. e, posteriormente, encontrada fortemente expressa nas glândulas salivares.

KORAYEM e colaboradores (2004) identificaram e caracterizaram uma mucina regulada por ecdisona em *Drosophila melanogaster* e que se encontra nos hemócitos, no intestino (membrana peritrófica) e nas glândulas salivares. Alguns autores investigando as funções imunes da mucina, descreveram que a mucina que é liberada a partir de hemócitos larvais torna-se parte do coágulo e participa do aprisionamento de bactérias. Eles sugeriram que as bactérias ligadas ao coágulo se tornam mais acessíveis a outras moléculas efetoras do sistema imunológico incluindo peptídeos antimicrobianos e fenoxidase. Desta forma, a coagulação torna-se parte integrante das reações imunes inatas em artrópodes (THEOPOLD et al., 2004). Mucinas já estavam relatadas como presentes em intestino de carrapatos, como *D. variabilis* (ANDERSON et al., 2008), bem como em glândula salivar (KARIM et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011). Neste estudo foi demonstrada a superexpressão de uma sequência para mucina no grupo tratado com a associação de *M. anisopliae* e cipermetrina. Contrariamente, MARTINS e colaboradores (2017) avaliando a resposta transcricional do intestino dos carrapatos *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma aureolatum* infectados com *Rickettsia rickettsii* relataram que uma sequência de mucina de *A. sculptum* e quatro sequências de *A. aureolatum* apresentaram subexpressão em análise de RNA-seq.

3.3.3.5.7 Receptor com repetições ricas em leucina

Os receptores do tipo Toll desempenham um papel crucial na resposta imune inata de artrópodes e atuam como o transdutor de sinal na via Toll (MICHEL et al, 2001). Os receptores Toll de artrópodes são todas proteínas de membrana tipo I com um ectodomínio consistindo em repetições ricas em leucina, um domínio trans-membrana e um domínio

homólogo intracelular Toll-interleucina que pode transduzir sinais (XU et al., 2000). Neste estudo, identificamos um gene com repetições ricas em leucina que pode codificar receptores Toll. O grupo tratado com o fungo *M. anisopliae* e o grupo tratado com a associação (*M. anisopliae* + cipermetrina) demonstraram aumento significativo na expressão de um gene codificante de um receptor com repetições ricas em leucina quando comparados com o controle.

3.3.3.5.8 Dual oxidase.

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) dependente de Dual oxidase (Duox) desempenha um papel importante na imunidade intestinal e no controle de bactérias associadas ao intestino em artrópodes (KUMAR et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Em *Drosophila* sp., as bactérias patogênicas oportunistas podem ser controladas desencadeando a imunidade intestinal dependente de Duox (LEE et al., 2013; BAE et al., 2010). EDENS e colaboradores (2001) usando RNAi em *Caenorhabditis elegans* (Rhabditida: Rhabditidae) para eliminar a expressão de *Duox1*, descobriram que o produto deste gene participa na biogênese da cutícula, a matriz extracelular colágena que forma a cobertura externa de nemátodos através da reticulação de tirosina. Os animais submetidos a RNAi apresentaram anormalidades grosseiras na cutícula. No presente estudo o grupo tratado com a associação de *M. anisopliae* + cipermetrina apresentou uma superexpressão na sequência para Dual oxidase.

3.3.3.5.9 Receptor de tirosina fosfatase

As fosfatases desempenham um papel fundamental não apenas nas funções fisiológicas das células (incluindo proliferação, diferenciação e transformação) de um organismo (TONKS & NEEL 2001), mas também nas interações hospedeiro-patógeno e no desenvolvimento do sistema imunológico (ZHU et al., 2012; BARTELS et al., 2010).

VINCENT e colaboradores (1993) observaram um aumento importante da atividade da fosfatase ácida nos hemócitos do gafanhoto migratório, *Melanoplus sanguinipes* (Orthoptera: Acrididae), infectado com *Beauveria bassiana*. No presente estudo os grupos tratados com a associação de *M. anisopliae* com cipermetrina e o grupo tratado com o fungo de forma isolada apresentaram uma superexpressão nas sequências codificantes para um receptor de tirosina fosfatase.

3.3.3.5.10 Imunoglobulina contendo domínio I-set

O domínio I-set está presente em imunoglobulinas da família Dscam (*Down syndrome cell adhesion molecule*), uma proteína encontrada na hemolinfa de artrópodes. A Dscam foi originalmente descoberta em *Drosophila melanogaster* como uma proteína envolvida na especificação da conexão neuronal. Ela também é produzida pelas células do corpo gorduroso e pelos hemócitos, que fazem parte do sistema imune dos artrópodes, e podem secretá-la na hemolinfa. Acredita-se que ela opsonize bactérias invasoras e auxilie em sua captura pelos fagócitos. O papel da Dscam na imunidade foi proposto quando foi observado que a fagocitose *in vitro* de *Escherichia coli* por hemócitos isolados que não possuíam a imunoglobulina Dscam eram menos eficientes que os normais (WATSON et al., 2005). Essas observações sugeriram que este gene pode ter evoluído para diversificar a capacidade dos artrópodes em reconhecer os patógenos. Essa função da Dscam foi confirmada no mosquito *Anopheles gambiae*, no qual o silenciamento do gene codificante da proteína homóloga à Dscam, a AgDscam, reduz a resistência natural do mosquito contra bactéria e contra o parasito da malária, o *Plasmodium* sp. (DONG et al., 2006). No carrapato *I. scapularis*, BRITES e colaboradores (2013) encontraram 27 genes com forte similaridade com Dscam. A superexpressão de genes relacionados às imunoglobulinas que contém o domínio I-set no grupo tratado com associação de *M. anisopliae* + cipermetrina pode estar relacionada com a

resposta imune à agressão sofrida pelo carrapato, representando uma nova via de defesa contra entomopatógenos.

3.3.3.5.11 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma importante hidrolase de artrópodes para manutenção das funções normais do sistema nervoso através da hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético bloqueando assim a transmissão do impulso nervoso. Os pesticidas das classes dos organofosforados e carbamato funcionam principalmente por ligação na AChE inibindo sua atividade catalítica (MACHADO et al., 2012). Quando a AChE é suprimida, a acetilcolina não pode ser degradada em tempo hábil e é acumulada na fenda sináptica, resultando em hiperatividade neural, convulsões, intoxicação e morte. Elas desempenham papéis importantes na manutenção das atividades fisiológicas normais no corpo (KONTOGIANNATOS et al., 2011). Enzimas do grupo das esterases, como a AChE, são consideradas também como ferramentas de desintoxicação em artrópodes, e por sua capacidade de biotransformação de compostos tóxicos exógenos são frequentemente associadas à resposta à agressão (ZHANG et al., 2001). Neste estudo, um gene que codifica uma acetilcolinesterase apresentou aumento da expressão no grupo tratado com a associação *M. anisopliae* + acaricida em relação ao controle e aos outros tratamentos isolados. Apesar das AChE serem alvo de alguns acaricidas, como os OF, neste trabalho utilizamos cipermetrina como acaricida. A cipermetrina, por sua vez, por se tratar de um piretróide sintético tem como alvo os canais de sódio.

DING e colaboradores (2015) mostraram que, no estágio inicial da infecção de larvas de *Xylotrechus rusticus* (Coleoptera: Cerambycidae) com o isolado BbCC01 de *B. bassiana*, a atividade de AChE aumentou significativamente e depois diminuiu com o passar do tempo de infecção. Às 72 horas após a infecção, as funções reguladoras imunes nas larvas mostraram

uma reação ao estresse com a atividade de AchE elevada e finalmente às 192 h pós infecção o sistema nervoso das larvas foi diretamente afetado. O aumento da expressão de AchE observado em nosso trabalho pode estar tanto associado a uma resposta inespecífica à agressão, como também pode representar novas interações de vias neurológicas frente à exposição à acaricidas. Foram realizados experimentos com a cepa São Gabriel de *R. microplus* afim de detectar os mecanismos de resistência desta cepa aos acaricidas piretróides (dados não mostrados). De acordo com os resultados obtidos, pode-se suspeitar do envolvimento de esterases na destoxificação da cipermetrina, já que foi detectado um aumento de toxicidade da droga em presença do TPP (trifenilfosfato), um inibidor de esterases (SCOTT, 1990). Dados semelhantes foram descritos por MILLER e colaboradores (1999) que demonstraram alterações das esterases, mesmo frente a exposição à acaricidas que não tenham como mecanismo de ação a inibição de AchE, como os piretróides.

Em linhas gerais, os resultados apresentados neste capítulo, chamam atenção pelo fato da associação *M. anisopliae* + cipermetrina ter produzido um aumento da expressão de genes importantes na resposta à agressão. Uma das limitações do nosso experimento foi a falta de replicatas em diferentes intervalos de tempos pós exposição para avaliar a resposta do carrapato *R. microplus* ao fungo *M. anisopliae*, ao acaricida e a associação destes. Uma análise temporal permitiria uma melhor caracterização dos mecanismos envolvidos na resposta a agressão sofrida tanto pela ação do fungo, quanto pela ação do acaricida e pela a associação de ambos. Pode-se hipotetizar que a diferença apresentada entre o grupo tratado com a associação e os grupos tratados de forma isolada, seria pelo fato da associação provocar maior estresse ao carrapato e este responderia em menor intervalo de tempo, levando a superexpressão de genes de defesa. As alterações observadas neste estudo compreendem o primeiro relato de genes diferencialmente expressos observado em carrapatos expostos a

tratamentos com fungo filamentosos, acaricida e sua associação, sugerindo novas possíveis vias moleculares relacionadas a infecção e à resposta à agressão em *R. microplus*.

Essas descobertas abrem novas possibilidades para entender os processos moleculares envolvidos na regulação da resposta do carrapato *R. microplus* quando exposto à agressão pelo fungo acaropatogênico *M. anisopliae*, pelo acaricida cipermetrina e pela associação dos dois tratamentos. Elucidar os mecanismos subjacentes à ativação das respostas à agressão sofrida pelo carrapato é crucial para o desenvolvimento de estratégias efetivas para o controle integrado do carrapato, utilizando ferramentas biológicas, químicas e de manejo. Futuramente, a interferência em alvos moleculares chave na resposta à agressão pode contribuir para incremento da eficácia dos métodos de controle.

3.3.4 Conclusões

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que a exposição à associação *M. anisopliae* + cipermetrina determinou um aumento da expressão de genes importantes na resposta à agressão, provavelmente pelo fato da associação fungo-acaricida provocar uma agressão maior ao carrapato e este responderia de forma mais rápida, levando à superexpressão de genes de defesa. As alterações observadas neste estudo são importantes pois compreendem ao primeiro relato observado em carrapatos expostos a tratamentos com fungo filamentosos, acaricida e sua associação.

3.3.5 Bibliografía

- AN, C., KANOST, M.R. *Manduca sexta* serpin-5 regulates prophenoloxidase activation and the Toll signaling pathway by inhibiting hemolymph proteinase HP6. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 683–689, 2010.
- ANDERSON, J. M., SONENSHINE, D. E., AND VALENZUELA, J. G. Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics*. 9:552, 2008.
- ARMSTRONG, P. B. The contribution of proteinase inhibitors to immune defense. *Trends Immunol*. 22, 47–52, 2001.
- ARRUDA, W., LUBECK, I., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp. Appl. Acarol*. 37, 231–244, 2005.
- ASANO, T., TAOKA, M., SHINKA, W.A.T, YAMAUCHI, Y., ISOBE, T., SATO, D. Identification of a cuticle protein with unique repeated motifs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Molec*. 43: 344–351, 2013.
- ASO, Y., YAMASHITA, T., MENO, K., MURAKAMI, M. Inhibition of prophenoloxidase-activating enzyme from *Bombyx mori* by endogenous chymotrypsin inhibitors. *Biochem Mol Biol Int* 33: 751–758, 1994.
- BAE, Y.S., CHOI, M.K., LEE, W.J. Dual oxidase in mucosal immunity and host-microbe homeostasis. *Trends Immunol*. Jul;31(7):278-87, 2010.
- BARRERO, R.A., GUERRERO, F.D., BLACK, M., MCCOOKE, J., CHAPMAN, B., SCHILKEY, F., PÉREZ DE LEÓN, A.A., MILLER, R.J., BRUNS, S., DOBRY, J., MIKHAYLENKO, G., STORMO, K., BELL, C., TAO, Q., BOGDEN, R., MOOLHUIJZEN, P.M., HUNTER, A., BELLGARD, M.I. Gene-enriched draft genome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: assembly by the hybrid Pacific Biosciences/Illumina approach enabled analysis of the highly repetitive genome. *Int J Parasitol*. Aug;47(9):569-583, 2017.
- BARTELS, S., GONZÁLEZ BESTEIRO, M.A., LANG, D., ULM, R. Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends Plant Sci*. 2010;15(6):322–329.
- Brites, D., Brena, C., Ebert, D., Du Pasquier, L. More than one way to produce protein diversity: duplication and limited alternative splicing of an adhesion molecule gene in basal arthropods. *Evolution*. Oct;67(10):2999-3011, 2013.
- BROWN, C.T., HOWE, A., ZHANG, Q., PYRKOSZ, A.B., BROM, T.H. A reference-free algorithm for computational normalization of shotgun sequencing data. *arXiv preprint arXiv:1203.4802*, 2012.
- BURGER, T.D., SHAO, R., BARKER, S.C. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Mol Phylogenet Evol*. 2014 Jul;76:241-53.
- CERAUL, S. M., CHUNG, A., SEARS, K. T., POPOV, V. L., BEIER-SEXTON, M., RAHMAN, M. S., AZAD AF A Kunitz protease inhibitor from *Dermacentor variabilis*, a vector for spotted fever group rickettsiae, limits *Rickettsia montanensis* invasion. *Infect. Immun*. 79, 321–329, 2011.
- CERAUL, S. M., DREHER-LESNICK, S. M., MULENGA, A., RAHMAN, M. S., AZAD, A. F. Functional characterization and novel rickettsiostatic effects of a Kunitz-type serine protease inhibitor from the tick *Dermacentor variabilis*. *Infect. Immun*. 76, 5429–5435, 2008.
- CHALLACOMBE, S.J., SWEET, S.P. Oral mucosal immunity and HIV infection: current status. *Oral Diseases* 8 (Suppl. 2), 55–62, 2002.

- DING, J.N., ZHANG, H.H., CHI, D.F. Effects of a Pathogenic *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) Strain on Detoxifying and Protective Enzyme Activities in *Xylotrechus rusticus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Florida Entomologist*, 98(4):1148-1156, 2015.
- DONG, Y., TAYLOR, H.E., DIMOPOULOS, G. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biol.* Jul;4(7):e229, 2006.
- EDENS, W.A., SHARLING, L., CHENG, G., SHAPIRA, R., KINKADE, J.M., LEE, T., EDENS, H.A., TANG, X., SULLARDS, C., FLAHERTY, D.B., BENIAN, G.M., LAMBETH, J.D. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol.* Aug 20;154(4):879-91, 2001.
- EGUCHI MIM, CHOU L. Y, NISHINO K Purification and characterization of a fungal protease specific protein inhibitor (FPI-F) in the silkworm haemolymph. *Comp Biochem Physiol B* 104B: 537–544, 1993.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M.C., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research*, 8, 175-185, 1998.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. In: Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines. Roma: Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, 53 p, 2004.
- FINN RD, ATTWOOD TK, BABBITT PC, BATEMAN A, BORK P, BRIDGE AJ, CHANG HY, DOSZTÁNYI Z, EL-GEBALI S, FRASER M, GOUGH J, HAFT D, HOLLIDAY GL, HUANG H, HUANG X, LETUNIC I, LOPEZ R, LU S, MARCHLER-BAUER A, MI H, MISTRY J, NATALE DA, NECCI M, NUKA G, ORENGO CA, PARK Y, PESSEAT S, PIOVESAN D, POTTER SC, RAWLINGS ND, REDASCHI N, RICHARDSON L, RIVOIRE C, SANGRADOR-VEGAS A, SIGRIST C, SILLITOE I, SMITHERS B, SQUIZZATO S, SUTTON G, THANKI N, THOMAS PD, TOSATTO SC, WU CH, XENARIOS I, YEHS LS, YOUNG SY, MITCHELL AL. InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res.* Jan 4;45(D1): D190-D199, 2017.
- FRAZZON, A.P.G, DA SILVA, V.I., MASUDA, A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 94, 117–125, 2000.
- FUKUDA, M., Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1573, 394–405, 2002.
- GOTZ, S., GARCIA-GOMEZ, J.M., TEROL, J., WILLIAMS, T.D., NAGARAJ, S.H., NUEDA, M.J., ROBLES, M., TALO, N.M., DOPAZO, J., CONESA, A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.*, 36, 3420–3435, 2008.
- GRABHERR, M.G., HAAS, B.J., YASSOUR, M., LEVIN, J.Z., THOMPSON, D.A., AMIT, I., ADICONIS, X., FAN, L., RAYCHOWDHURY, R., ZENG, Q., CHEN, Z., MAUCELI, E., HACOEN, N., GNIRKE, A., RHIND, N., DI PALMA, F., BIRREN, B.W., NUSBAUM, C., LINDBLAD-TOH, K., FRIEDMAN, N., REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*, 29, 644-652, 2011.
- GULLEY, M. M., ZHANG, X., MICHEL, K. The roles of serpins in mosquito immunology and physiology. *J. Insect Physiol.* 59, 138–147, 2013.
- HAAS, B.J., PAPANICOLAOU, A., YASSOUR, M., GRABHERR, M., BLOOD, P.D., BOWDEN, J., COUGER, M.B., ECCLES, D., LI, B., LIEBER, M., MACMANES, M.D., OTT, M., ORVIS, J., POCHET, N., STROZZI, F., WEEKS, N., WESTERMAN,

- R., WILLIAM, T., DEWEY, C.N., HENSCHER, R., LEDUC, R.D., FRIEDMAN, N., REGEV, A. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols*, 8, 1494-1512, 2013.
- HE, N., BOTELHO, J.M., MCNALL, R.J., BELOZEROV, V., DUNN, W.A., MIZE, T., ORLANDO, R., WILLIS, J.H. Proteomic analysis of cast cuticles from *Anopheles gambiae* by tandem mass spectrometry. *Insect Biochem Mol Biol.* Feb;37(2):135-46, 2007.
- HE, N., ASO, Y., FUJII, H., BANNO, Y., YAMAMOTO, K. *In vivo* and *in vitro* interactions of the *Bombyx mori* chymotrypsin inhibitor b1 with *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 835–840, 2004.
- KARIM, S., SINGH, P., AND RIBEIRO, J. M. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. *PLoS ONE* 6:e28525, 2011.
- KOLCH, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J. Review.* Oct 15;351 Pt 2:289-305, 2000.
- KONTOGIANNATOS, D., MICHAEL, X., KOURTI, A. Molecular characterization of an ecdysteroid inducible carboxylesterase with GQSCG motif in the corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *J Insect Physiol.* Jul;57(7):1000-9, 2011.
- KOOLMAN, J. Ecdysone. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, Germany, 1989.
- KORAYEM, A.M., FABBRI, M., TAKAHASHI, K., SCHERFER, C., LINDGREN, M., SCHMIDT, O., UEDA, R., DUSHAY, M.S., THEOPOLD, U. A *Drosophila* salivary gland mucin is also expressed in immune tissues: evidence for a function in coagulation and the entrapment of bacteria. *Insect Biochem Mol Biol.* Dec;34(12):1297-304, 2004.
- KORAYEM, A.M., FABBRI, M., TAKAHASHI, K., SCHERFER, C., LINDGREN, M., SCHMIDT, O., UEDA, R., DUSHAY, M.S., THEOPOLD, U. A *Drosophila* salivary gland mucin is also expressed in immune tissues: evidence for a function in coagulation and the entrapment of bacteria. *Insect Biochem Mol Biol.* Dec;34(12):1297-304, 2004.
- KUMAR, S., MOLINA-CRUZ, A., GUPTA, L., RODRIGUES, J., BARILLAS-MURY, C. A peroxidase/ dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in *Anopheles gambiae*. *Science* 327:1644–1648, 2010.
- LEE, J.R., URBAN, S., GARVEY, C.F., & FREEMAN, M. Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell* 107: 161–171, 2001.
- LEE, K.A., KIM, S.H., KIM, E.K., HÁ, E.M., YOU, H., KIM, B., KIM, M.J., KWON, Y., RYU, J.H., LEE, W.J. Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell.* May 9;153(4):797-811, 2013.
- LEEMON, D.M & JONSSON, N.N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 40–49, 2008.
- LEONARD, A. E., PEREIRA, S. L., SPRECHER, H. & HUANG, Y. S. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 43, 36–54, 2004.
- LIU, Y., SHEN, D., ZHOU, F., WANG, G., AN, C. Identification of immunity-related genes in *Ostrinia furnacalis* against entomopathogenic fungi by RNA-seq analysis. *PLoS One.* Jan 17;9(1):e86436, 2014.
- MACHADO, D.G., CUNHA, M.P., NEIS, V.B., BALEN, G.O., COLLA, A., GRANDO, J., BROCARDO, P.S., BETTIO, L.E., CAPRA, J.C., RODRIGUES, A.L. Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 103: 220–229, 2012.

- MARTINS, L.A., GALLETTI, M.F.B.M., RIBEIRO, J.M., FUJITA, A., COSTA, F.B., LABRUNA, M.B., DAFFRE, S., FOGAÇA, A.C. 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. *Front Cell Infect Microbiol.* Apr 28;7:129, 2017.
- MARTINS, J.R. & FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet. Rec.* 149, 64, 2001.
- MAYER, U. & NUSSLEIN-VOLHARD, C. A group of genes required for pattern formation in the ventral ectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes & Dev.* 2: 1496–1511, 1988.
- MICHEL, T., REICHHART, J.M., HOFFMANN, J.A., ROYET, J. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 414: 756–759, 2001.
- MILLER, R. J.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, v. 36, p. 533-538, 1999.
- MOGHAL, N. & STERNBERG, P.W. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol.* Apr;11(2):190-6, 1999.
- MOUSSIAN B. Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochem Molec.* 40: 363–375, 2010.
- NIRMALA, X., KODRIK, D., ZUROVEC, M., SEHNAL, F. Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. *Eur J Biochem* 268: 2064–2073, 2001.
- OLIVEIRA, J.H., GONÇALVES, R.L., LARA, F.A., DIAS, F.A., GANDARA, A.C., MENNA-BARRETO, R.F., EDWARDS, M.C., LAURINDO, F.R., SILVA-NETO, M.A., SORGINE, M.H., OLIVEIRA, P.L. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLoS Pathog.* Mar;7(3):e1001320, 2011.
- ORIHIEL, T.C., The peritrophic membrane: its role as a barrier to infection of the arthropod host. In: Maramorosch, K., Shope, R.E. (Eds.), *Invertebrate Immunity*. Academic Press, New York, pp. 67–73, 1975.
- PAL, S., ST LEGER, R.J., WU, L.P. Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem.* Mar 23;282(12):8969-77, 2007.
- PARVY, J.P., NAPAL, L., RUBIN, T., POIDEVIN, M., PERRIN, L., WICKER-THOMAS, C., MONTAGNE, J. *Drosophila melanogaster* Acetyl-CoA-carboxylase sustains a fatty acid-dependent remote signal to waterproof the respiratory system. *PLoS Genet.* 8(8):e1002925, 2012.
- PENNING, T. M., BENNETT, M. J., SMITH-HOOG, S., SCHLEGEL, B. P., JEZ, J. M. AND LEWIS, M. Structure and function of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Steroids* 62, 101–111, 1997.
- PERINOTTO, W.M.S., ANGELO, I.C., GOLO, P.S., CAMARGO, M.G., QUINELATO, S., SANTI, L., VAINSTEIN, M.H., BEYS-DA-SILVA, W.O., SALLES, C.M.C., BITTENCOURT, V.R.E.P. *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae) Pr1 activity: biochemical marker of fungal virulence in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 24,123–132, 2014.
- RAMESH, N., SUGUMARAN, M., MOLE, J.E. Purification and characterization of two trypsin inhibitors from the hemolymph of *Manduca sexta* larvae. *J Biol Chem* 263: 11523–11527, 1988.
- REICHHART, J.M., GUBB, D., LECLERC, V. The *Drosophila* serpins: multiple functions in immunity and morphogenesis. *Methods Enzymol* 499: 205–225, 2011.

- RIBEIRO, J. M., ANDERSON, J. M., MANOUKIS, N. C., MENG, Z., AND FRANCISCHETTI, I. M. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. BMC Genomics 12:136, 2011.
- ROBINSON, M.D., MCCARTHY, D.J., SMYTH, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics, 26, 139-140, 2010.
- SCOTT, J. G. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies, and pitfalls. In: TABASHNIK, B. E.; ROUSH, B. E. Pesticide Resistance in Arthropods. New York: Chapman & Hall, Inc. p. 39-57, 1990.
- SILVA, A.X., JANDER, G., SAMANIEGO, H., RAMSE, J.S., FIGUEROA, C.C. Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae): a transcriptomic survey. Plos One.; 7: e 36366, 2012.
- THEOPOLD, U., DORIAN, C., SCHMIDT, O. Changes in glycosylation during *Drosophila* development. The influence of ecdysone on hemomucin isoforms. Insect Biochemistry and Molecular Biology 31, 189–197, 2001
- THEOPOLD U, SCHMIDT O, SÖDERHÄLL K, DUSHAY MS. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. Trends Immunol. Jun;25(6):289-94, 2004.
- TONKS, N.K., NEEL, B.G. Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. Curr Opin Cell Biol.;13 (2):182, 2001.
- TRIPATHI, L.P., SOWDHAMINI, R. Genome-wide survey of prokaryotic serine proteases: analysis of distribution and domain architectures of five serine protease families in prokaryotes. BMC Genomics 9: 549, 2008.
- URBAN, S., LEE, J.R., & FREEMAN, M. *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. Cell 107: 173–182, 2001.
- URBAN, S., LEE, J.R., FREEMAN, M. A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands. EMBO J. Aug 15;21(16):4277-86, 2002.
- VEGA, F.E., KAYA, H.F. Insect pathology. Academic Press, 2012.
- VINCENT, M.J., MIRANPURI, G.S., KHACHATOURIANS, G.G. Acid phosphatase activity in hemolymph of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*, during *Beauveria bassiana* infection. Entomol Exp et Appl.;67(2):161–166, 1993.
- VOGEL, H., ALTINCICEK, B., GLOCKNER, G., VILCINSKAS, A. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. BMC Genomics 12: 308, 2011.
- WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet. Jan;10(1):57-63, 2009.
- WANG, C., ST LEGER, R.J. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. Eukaryotic Cell. 6, 808-816, 2007.
- WATSON, F.L., PÜTTMANN-HOLGADO, R., THOMAS, F., LAMAR, D.L., HUGHES, M., KONDO, M., REBEL, V.I., SCHMUCKER, D. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. Science. Sep 16;309(5742):1874-8. 2005.
- WEBSTER, A., RECK, J., SANTI, L., SOUZA, U.A., DALL'AGNOL, B., KLAFKE, G.M., BEYS-DA-SILVA, W.O., MARTINS, J.R., SCHRANK, A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. Vet Parasitol. Jan 30;207(3-4):302-8, 2015.
- WEIHOFEN, A. & MARTOGLIO, B. Intramembrane-cleaving proteases: Controlled liberation of proteins and bioactive peptides. Trends Cell Biol. 13: 71–78, 2003.

- WIGGLESWORTH V.B. The principles of insect physiology. Ed. Chapman e Hall, 7th ed., London, 827p, 1972.
- WOLFE, M.S. & KOPAN, R. Intramembrane proteolysis: Theme and variations. *Science* 305: 1119–1123, 2004.
- XING, D., YANG, Q., JIANG, L., LI, Q., XIAO, Y., YE, M., XIA, Q. RNA-Seq Analyses for Two Silkworm Strains Reveals Insight into Their Susceptibility and Resistance to *Beauveria bassiana* Infection. *Int J Mol Sci.* Feb 10;18(2). pii: E234, 2017.
- XU, Y., TAO, X., SHEN, B., HORNG, T., MEDZHITOV, R., MANLEY, J.L., TONG, L. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature.* 408: 111–115, 2000.
- YU S, DING L, LUO R, LI X, YANG J, LIU H, CONG L, RAN C. Identification of Immunity-Related Genes in *Dialeurodes citri* against Entomopathogenic Fungus *Lecanicillium attenuatum* by RNA-Seq Analysis. *PLoS One.* Sep 19;11(9): e 0162659, 2016.
- ZHANG J, GOYER C, PELLETIER Y. Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Mol Biol.*; 17: 209–216, 2008.
- ZHANG, W., MENG, J., NING, J., QIN, P., ZHOU, J., ZOU, Z., WANG, Y., JIANG, H., AHMAD, F., ZHAO, L., SUN, J. Differential immune responses of *Monochamus alternatus* against symbiotic and entomopathogenic fungi. *Sci China Life Sci.* Aug;60(8):902-910, 2017.
- ZHANG, Y.G., WANG, Z.G., HUANG, D.Z. Interrelation between carboxylesterase and glutathione-S-transferase in *Apriona germari* larvae and secondary metabolites of poplar trees. *Scientia Silvae Sinicae* 37: 106–111, 2001.
- ZHENG, T., LI, H., HAN, N., WANG, S., HACKNEY PRICE, J., WANG, M., ZHANG, D. Functional Characterization of Two Elongases of Very Long-Chain Fatty Acid from *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Sci Rep.* Sep 8;7(1):10990, 2017.
- ZHU, P., LI, X., LI, Z. Roles of phosphatases in pathogen infection: a review. *Chin J Biotechnol.* 28(2):154–163, 2012.

4. DISCUSSÃO GERAL

O controle do carrapato bovino é majoritariamente realizado pelo uso de acaricidas, em especial compostos organofosforados, piretróides, amitraz, lactonas macrocíclicas, fipronil e fluazuron (KLAFKE, 2009). Esse controle acarreta, pelo menos, dois efeitos negativos: (i) a contaminação do ambiente e do produto final (carne, leite) e (ii) a seleção de cepas de carrapatos resistentes aos acaricidas. Portanto, são metas desta área o levantamento de dados sobre as populações de carrapatos resistentes aos acaricidas e o desenvolvimento de métodos mais eficientes/sustentáveis de controle, como o controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos (BEYS DA SILVA *et al.*, 2012).

BAHIENSE e colaboradores (2006) sugeriram que a alternativa para controle de cepas resistentes aos acaricidas seria o uso associado do controle biológico e químico. Assim, em um estudo prévio conduzido pelo nosso grupo (WEBSTER *et al.*, 2015) foi avaliada a compatibilidade de *M. anisopliae* (TIS-BR03) com cinco formulações de acaricidas comerciais. As porcentagens mínimas de viabilidade do fungo foram observadas com amitraz (63%, 48 hpi) e diazinon (67%, 96 hpi). Foi determinado que a combinação de OF e PS (0,05% de clorpirifós e 0,02% de cipermetrina) não induziu qualquer alteração na viabilidade do fungo. SCHUMACHER & POEHLING (2012) demonstraram a compatibilidade de dois isolados de *M. anisopliae* (MA-K e MA-7) com amitraz e permetrina e BATISTA FILHO e colaboradores (2001), usando o isolado SPL 358 de *M. anisopliae*, demonstraram que a deltametrina não inibiu o crescimento vegetativo, mas inibiu a produção de esporos fúngicos. A aplicabilidade de *M. anisopliae* de forma isolada ou em combinação com acaricidas químicos para controlar *R. microplus* resistentes a acaricidas em condições de campo já foi demonstrada, assim como a combinação de *M. anisopliae* com acaricidas comerciais pode aumentar a eficácia do tratamento (WEBSTER *et al.*, 2015). Sua combinação poderia ser uma alternativa interessante no desafio emergente contra cepas multirresistentes de carrapatos aos

acaricidas, já que populações de cepas resistentes a todas as classes de acaricidas disponíveis no mercado já foram relatadas (RECK et al., 2014a).

Devido ao seu modo de infecção através da cutícula, pode-se considerar, de forma análoga, que os fungos funcionam como acaricidas de contato (THOMAS & READ, 2007). A identificação de patógenos de artrópodes para biocontrole envolve um esforço a longo prazo para encontrar microrganismos que ocorram naturalmente e que sejam capazes de controlar populações de artrópodes pragas. Isso geralmente envolve a seleção de isolados patogênicos para artrópodes-alvo sem considerar os mecanismos envolvidos ou o papel desses fungos em seus habitats naturais. Estes fungos são conhecidos por empregar uma vasta gama de moléculas para auxiliar na infecção e para competir com outros microrganismos, e estudos genéticos recentes revelaram os mecanismos e a importância da distribuição destas moléculas para a virulência (DONZELLI & KRASNOFF, 2016).

Os bioensaios para avaliação de isolados de *M. anisopliae* devem ser realizados em condições discriminatórias que tentem replicar as condições em que o patógeno será utilizado (BUTT & GOETTEL, 2000). Isso muitas vezes levou a uma busca de "novos e melhores" isolados em vez de investigar fatores subjacentes impactando o desempenho no ambiente. Sem diminuir o valor implícito da procura de novos organismos, é necessária mais ênfase na pesquisa para abordar fatores críticos para transformar o "potencial" em "produto" viável. Os isolados devem ser ecologicamente competentes para funcionar e persistir no ambiente da praga alvo, e a seleção de candidatos deve basear-se no desempenho em um sistema de bioensaio otimizado. A padronização de um teste para avaliar o efeito do *M. anisopliae* em populações do carrapato *R. microplus* e sua incorporação na escolha de determinado isolado do fungo permitirá a seleção de isolados mais adaptados para a aplicabilidade no campo. Embora o teste *in vitro* possa fornecer informações valiosas sobre respostas do organismo, ele não pode ser diretamente extrapolado para prever as eficácias em condições de campo, mas,

sim servir de indicadores.

Há muitos anos é estudada e discutida a questão da aplicabilidade de isolados fúngicos para o controle de carrapatos. Foram realizados diversos experimentos *in vitro* para seleção dos isolados mais virulentos (FRAZZON et al., 2000; ONOFRE et al., 2001; FERNANDES et al., 2004; ARRUDA et al., 2005; BAHIENSE et al., 2006; PERINOTTO et al., 2014). Estes isolados começaram a servir como “padrão” para estabelecer a suscetibilidade de artrópodes à infecção por fungos entomopatogênicos. Neste processo, muito isolados considerados pouco patogênicos foram descartados dos ensaios e os considerados muito patogênicos continuaram a ser utilizados para uma possível aplicabilidade a nível de campo. Em nosso estudo, foi demonstrado que há uma grande variabilidade na suscetibilidade do carrapato *R. microplus* a um isolado de *M. anisopliae*, até então considerado extremamente patogênico para insetos e carrapatos. Este *status* de patogenicidade foi adquirido ao longo dos anos em observações laboratoriais e utilizando colônias de insetos e cepas padrões de carrapatos, mantidas sem a interferência de fatores ambientais que existem no campo. O ponto a ser enfatizado é que da mesma maneira que um isolado considerado patogênico, alcança níveis de controle menores que 30%, há de ter outros isolados antes considerados pouco patogênicos que sejam capazes de proporcionar um controle mais elevado nessas populações de carrapatos.

A falta de dados de campo deve-se, em parte, à complexidade do meio ambiente e às intrincadas interações entre diferentes fatores ambientais e biológicos que podem confundir observações em torno de causa e efeito (JARONSKI, 2007). Do mesmo modo, as interações entre fatores bióticos e abióticos, por exemplo, luz solar, umidade, manejo do solo, afetam a eficácia e a persistência de tratamentos fúngicos aplicados contra pragas (JARONSKI, 2010). Fungos como *M. anisopliae* são comumente encontrados em solos cultivados e não mexidos, embora sua distribuição natural parece estar ligada ao habitat (MEYLING et al., 2009) e as populações de solo são influenciadas pelas práticas agrícolas. É necessário investir mais

esforços na avaliação dos efeitos das práticas agrícolas sobre a persistência e particularmente a eficácia em condições de campo (HUMMEL et al., 2002). Os hospedeiros são críticos para a sobrevivência a longo prazo de muitas espécies de fungos entomopatogênicos. O acesso e a infecção bem-sucedida de um hospedeiro é a única maneira pela qual algumas espécies podem se multiplicar significativamente. A prevalência de fungos ao longo do tempo pode, portanto, estar intimamente correlacionada com a presença de populações de artrópodes suscetíveis (MEYLING & EILENBERG, 2007). O uso de inseticidas pode contribuir para o declínio das populações de fungos, reduzindo a disponibilidade de hospedeiros adequados em vez de ter efeitos negativos diretos sobre a sobrevivência de fungos (KLINGEN & HAUKELAND, 2006).

A maior parte do que se sabe a respeito de ativação do sistema imune em carrapatos foi extrapolado de estudos realizados em outros artrópodes, como por exemplo *Drosophila* sp.. O pouco conhecimento que se tem a respeito da ativação do sistema imunológico em carrapatos está baseado em estudos realizados em microrganismos que utilizam o carrapato como vetor para atingir seus hospedeiros vertebrados, como por exemplo os patógenos *Rickettsia* sp. e *Borrelia* sp. (SONENSHINE & MACALUSO, 2017). Não há como inferir que as respostas desencadeadas por organismos que utilizam o carrapato como “ponte” para alcançar seu hospedeiro, cause danos comparáveis aos patógenos diretos de carrapatos, como fungos filamentosos, que precisam utilizar os substratos presentes em seus hospedeiros para poder se desenvolverem e completarem seus ciclos. Como já foi ressaltado anteriormente, uma infecção bem sucedida é chave importante para propagação do fungo no meio ambiente, e isto acontece através da morte do hospedeiro artrópode.

Os resultados obtidos em experimentos anteriores *in vivo* pelo nosso grupo (WEBSTER et al., 2015), juntamente com os dados *in vitro* e em nível molecular apresentados aqui evidenciam que há um efeito sinérgico e não apenas aditivo na utilização da

associação de *M. anisopliae* com acaricida sintético para o controle de cepas resistentes a acaricidas de *R. microplus*. Um efeito aditivo simples é definido como um efeito esperado quando diferentes drogas ou extratos são usados em conjunto. O sinergismo é definido como um efeito maior do que um efeito aditivo (CHOU, 2010). Foram demonstradas experimentalmente evidências em nível molecular de um efeito sinérgico na regulação da expressão gênica do tratamento associado entre o fungo *M. anisopliae* e o acaricida cipermetrina. Isto é evidenciado quando observamos que os genes diferencialmente expressos no grupo tratado com fungo e acaricida não constituem meramente o somatório do conjunto de genes alterados nos tratamentos com fungo ou acaricida isoladamente.

Apesar do tratamento químico para carrapatos ser utilizado há mais de 100 anos (ANGUS, 1996), pouco se sabe dos mecanismos de resposta à agressão que o acaricida sintético causa no hospedeiro alvo. O controle biológico é estudado e recomendado para o controle de carrapatos há mais de 20 anos (SCHRANK & VAINSTEIN, 2010), com excelentes resultados em laboratório, mas surpreendentemente pouco se sabe a respeito das respostas do organismo alvo quando infectado com o microrganismo. O entendimento da biologia básica da interação patógeno-hospedeiro é essencial nos aspectos relacionados ao tratamento. Compreender a fisiologia do hospedeiro quando exposto ao agressor possibilita o investimento em esforços para o desenvolvimento de novas tecnologias que visem alvos ainda não trabalhados, possíveis de serem utilizados para o controle do carrapato bovino. A interferência em alvos moleculares chave na resposta à agressão pode contribuir para incremento da eficácia dos métodos de controle.

Os dados aqui apresentados demonstram que *M. anisopliae* e acaricida (cipermetrina) agem sinergicamente e de forma mais eficaz para controlar carrapatos. Assim, a possibilidade de combinação de estratégias diferentes e complementares no controle deste ectoparasita, como a utilização de controle químico convencional por acaricidas e controle biológico com

microrganismos, como fungos entomopatogênicos, deve ser considerado como recurso para controlar carrapatos com elevado nível de resistência aos acaricidas. O sinergismo evidenciado em nossos estudos, comprova a ideia de que o controle integrado, utilizando o controle biológico com o controle químico é uma opção tanto para o controle de cepas de carrapatos resistentes à acaricidas, quanto para um controle mais rápido de cepas de carrapatos que não apresentam resistência ou que apresentem resistência intermediária. A utilização potencial de acaricidas químicos associados com agentes biológicos pode estimular o uso e a consolidação do controle biológico para parasitas animais entre profissionais e agricultores.

5. CONCLUSÕES

- O teste de imersão de larvas (TIL) resulta em maior mortalidade em um tempo menor quando comparado ao teste de pacote de larvas (TPL) usando o mesmo isolado de fungo.
- Populações de campo de *R. microplus* mostram uma alta variação em sua suscetibilidade a um mesmo isolado de *M. anisopliae*.
- A associação *M. anisopliae* + cipermetrina aumentou a expressão de genes importantes na resposta à agressão.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. *Controle microbiano de insetos. Ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz*, 2a ed., Piracicaba, 1998.
- ALVES, S. B.; MOINO, J. R. & ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. *In: Controle Microbiano de Insetos*. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, p. 217-238, 1998.
- ANGUS, B.M. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *Int. J. Parasitol.* 26, 1341–1355, 1996.
- ARRUDA, W.; LUBECK, I.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* structures during the penetration events leading to the infection of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*. 37: 231-244, 2005.
- BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E. K. K & BITTENCOURT, V. R. E. P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Veterinary Parasitology*, v. 141, p 319–324, 2006.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M. & LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, v. 30, n. 3, p. 437-447, Sep. 2001.
- BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L.; CORRÊA, A. P.; SILVA, L. A.; BRESCIANI, F. R.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. *Fungal Biol*, 114 (11-12):911-6, 2010.
- BRINTON, L.P.; BURGDORFER, W. Fine structure of normal hemocytes in *Dermacentor andersoni* stiles (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology*, v. 57, n. 5, p.1110-1127, 1971.
- BUTT, T.M. & GOETTEL, M.S. Bioassays of Entomogenous Fungi. In: Navon, A. and Ascher, K.R.S., Eds., *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*, CAB International, Wallingford, UK, 141-195, 2000.
- CASTRO, A. B. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. & DAEMON E. Eficácia in vivo do fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado 959) sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. *Revista Universidade Rural*, 19: 73-82, 1997.
- CERENIUS, L., KAWABATA, S., LEE, B.L., NONAKA, M., & SODERHALL, K. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends in Biochemical Sciences*, 35, 575 e 583, 2010.
- CHARROUX, B., & ROYET, J. *Drosophila* immune response: from systemic antimicrobial peptide production in fatbody cells to local defense in the intestinal tract. *Fly (Austin)*, 4, 40 e 47, 2010.
- CHOU, T.C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* Jan 15;70(2):440-6, 2010.
- CORREIA, A. C. B.; FIORIN, A. C, MONTEIRO, A. C. & VERÍSSIMO, C. J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 189-191, 1998.
- DA SILVA SB, SAVASTANO G, BITTENCOURT VR. Cellular types involved in the immune response of females engorged of *Boophilus microplus* inoculated with *Metarhizium anisopliae* and *Penicillium* sp.]. *Rev Bras Parasitol Vet.* Jul-Sep;15(3):128-31, 2006.
- DA SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. Cuticle-induced

- endo/exoactingchitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the chi3 gene. *Research in Microbiology*, 156: 382–392, 2005.
- DONZELLI, B.G. & KRASNOFF, S.B. Molecular Genetics of Secondary Chemistry in *Metarhizium Fungi*. *Adv Genet.*;94:365-436, 2016.
- DRIVER F, MILNER R. J. & TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104: 134-150, 2000.
- ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp. App. Acarol.*, v. 38, p. 219-235, 2006.
- EVANS, C.J., & BANERJEE, U. Transcriptional regulation of hematopoiesis in *Drosophila*. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 30, 223 e 228, 2003.
- FERNANDES, E. K, COSTA, G. L, MORAES, A. M. & BITTENCOURT, V. R. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Basic Microbiology*.44: 270-274, 2004.
- FISHER, R.C.; GANESALINGAM, V.K. Changes in the compositions of host haemolymph after attack by an insect parasitoid. *Nature*, v. 227, n. 5254, p. 191-192, 1970.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *In: Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines*. Roma: Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, 53 p, 2004.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Tick and tick-borne diseases: selected articles from the World Animal Review, vol. 36. FAO Animal Production and Health Paper, Rome, Italy, 1983.
- FRAZZON, A. P. G.; VAZ, Jr. I. V. S.; MASUDA, A.; SCHRANK. A, & VAINSTEIN M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 93: 117-125, 2000.
- FREIMOSER, F.M., HU, G., & ST LEGER, R.J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology*, 151, 361 e 371, 2005.
- FREITAS, D. R. J.; POHL, P. C. & VAZ, I. S. J. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.33, p. 109- 17, 2005.
- GAO, Q., JIN, K., YING, S.H., ZHANG, Y., XIAO, G., SHANG, Y.,WANG, C. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genetics*, 7, e 1001264, 2011.
- GEORGE, J. E. Present and future technologies for tick control. *Ann. NY Acad. Sci.* v. 916, p. 583-588, 2000.
- GLIŃSKI, Z.; JAROSZ, J. Infection and immunity in the honey bee *Apis mellifera*. *Apiacta*, v.36, p.12-24, 2001.
- GOETTEL, M.S., HAJEK, A.E., SIEGEL, J.P., & EVANS, H.C. Safety of fungal biocontrol agents. In T.M. Butt, C. Jackson, & N. Magan (Eds.), *Fungi as biocontrol agents, progress, problems, and potential* (pp.347 e 375). Wallingford, UK: CAB International, 2001.
- GONZALES, J. C. In: *O Controle do Carrapato do Boi*. 3.Ed. Passo Fundo, Ed. da Universidade de Passo Fundo, 128 p., 2003.
- GONZALEZ-ACUÑA D. & GUGLIELMONE A. A. Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae: Ixodidae) of Chile. *Experimental and Applied Acarology*, 35: 147-163, 2005.

- GOTTAR, M., GOBERT, V., MATSKEVICH, A.A., REICHHART, J.M., WANG, C., BUTT, T.M, FERRANDON, D. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*, 127, 1425 e 1437, 2006.
- GRAF, J. F., R. GOGOLEWSKI, N. LEACH-BING, G. A. SABATINI, M. B. MOLENTO, E. L. BORDIN, AND G. J. ARANTES. Tick control: an industry point of view. *Parasitology* 129:S427-S442, 2004.
- GRISI, L., LEITE, R.C., MARTINS, J.R.S., BARROS, A.T.M., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P.H.D., LEÓN, A.A.P., PEREIRA, J.B., VILLELA, H.S., Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz. J. Vet.Parasitol.* 23, 150–156, 2014.
- GUERRERO, F. D., L. LOVIS, AND J. R. MARTINS. Acaricide Resistance Mechanisms in *Rhipicephalus microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21:1-6, 2012.
- GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P.; MARTINS, J. R. S. & ESTRADA-PEÑA, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: Barros-Battesti, D.MB.; Arzua, M.; Bechara, G.H (Eds). Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: *In: Um guia ilustrado para identificação de espécies*. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo/BR, P.115-138, 2006.
- GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C. & BARROS-BATTESTI, D. M. In: *Ectoparasitos de importância veterinária*, Editora Plêiade, São Paulo, 2001.
- HE, H., CHEN, A.C., DAVEY, R.B., IVIE, G.W., GEORGE, J.E. Identification of a point mutation in the para- type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 558- 561, 1999.
- HIROMORI, H. & NISHIGAKI J. Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Appl. Entomol. Zool*, 36 (2): 231–236, 2001.
- HORN, S.C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos no Brasil. 2.ed. Brasília: Ministério da Agricultura. 79p. 1983.
- HU, X., XIAO, G., ZHENG, P., SHANG, Y., SU, Y., ZHANG, X, WANG, C. Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 16796 e 16801, 2014.
- HUMBER, R.A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. *J Invertebr Pathol.* Jul;98(3):262-6, 2008.
- HUMMEL R.L., WALEGENBACH J. F., BARBERCHECK M.E., KENNEDY G.G., HOYT G.D., ARELLANO C. Effects of production practices on soil-borne entomopathogens in western North Carolina vegetable systems. *Environ. Entomol.*, 31, 84–91, 2002.
- HUXHAM, I.M.; LACKIE, A.M.; McCORKINDALE, N.J. Inhibitory effect of cyclodepsipeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on cellular immunity in insects. *Journal of Insect Physiology*, v. 35, n. 2, p. 97- 105, 1989.
- INTERNATIONAL CONSORTIUM OF TICKS AND TICK-BORNE DISEASES (ICTTD). Ticks of Veterinary and Medical Importance. A series of three CD's on ticks on livestock in Africa, the Mediterranean Region and Latin America 2004. (<http://www.icttd.nl>).
- JAMROZ, R.C., GUERRERO, F.D., PRUETT, J.H., OEHLER, D.D., MILLER, R.J. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *J. Insect Physiol* 46, 685-695, 2000.
- JARONSKI, S.T, & JACKSON, M.A. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Sci. Technol.*, 18, 849-863, 2008.

- JARONSKI, S.T. Soil ecology of the entomopathogenic ascomycetes: a critical examination of what we (think) we know. In K. Maniana & Ekesi (Eds). Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest management. Kerala Research Signpost. pp. 91-144, 2007
- JARONSKI, S.T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *Bio Control*, 55, 159 e 185, 2010.
- JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol*, 137, 1–10, 2006.
- JONSSON, N. N.; BOCK, R. E. & JORGENSEN, W.K. 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. *Veterinary Parasitology*, 155 1–9, 2008.
- JONSSON, N.N., CUTULLE, C., CORLEY, S.W., SEDDON, J.M. Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* associated with resistance to flumethrin but not to cypermethrin. *Int. J. Parasitol.* 40, 1659-1664, 2010.
- JUNGES Â, BOLDO JT, SOUZA BK, GUEDES RL, SBARAINI N, KMETZSCH L, THOMPSON CE, STAATS CC, DE ALMEIDA LG, DE VASCONCELOS AT, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. Genomic analyses and transcriptional profiles of the glycoside hydrolase family 18 genes of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *PLoS One*. Sep 18;9(9):e107864, 2014.
- KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N. & OUNA, E. A. Prospects for biological control of livestock tick *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 15-20, 1996.
- KHAN, S., GUO, L., MAIMAITI, Y., MIJIT, M., QIU, D. Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Mol. Plant Breed* 3: 63–79, 2012.
- KLAFKE G, WEBSTER A, DALL AGNOL B, PRADEL E, SILVA J, DE LA CANAL LH, BECKER M, OSÓRIO MF, MANSSON M, BARRETO R, SCHEFFER R, SOUZA UA, CORASSINI VB, DOS SANTOS J, RECK J, MARTINS JR. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*. Jan;8(1):73-80, 2017.
- KLAFKE, G. M. Resistência de *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas. In: Pereira, M. C.; Labruna, M. B.; Szabó, M.J. P.; Klafke, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus – Biologia, controle e resistência*. MedVet Livros, São Paulo, p. 81-106, 2009.
- KLINGEN, I. & HAUKELAND, S. The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: Eilenberg, J., Hokkanen, H.M.T. (Eds.), *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*. Springer, Netherlands, pp. 145–211, 2006.
- LACEY LA, GRZYWACZ D, SHAPIRO-ILAN DI, FRUTOS R, BROWNBRIDGE M, GOETTEL MS. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J Invertebr Pathol*. Nov;132:1-41, 2015.
- LACEY, L. A., MARTINS, A. & RIBEIRO, C. The pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* for adults of the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Eur. J. Entomol*, 91, 313–319, 1994.
- LEMAITRE, B., & HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25, 697 e 743, 2007.
- LI AY, DAVEY RB, MILLER RJ, GUERRERO FB, GEORGE JE. Genetics and Mechanisms of Permethrin Resistance in the Santa Luiza Strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. 45(3): 427-438, 2008.

- LIU, Z.Y.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J.; YAO, Y. J. & LIU, A. Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 178-182, 2001.
- LU, H.L., ST LEGER, R.J. Insect Immunity to Entomopathogenic Fungi. *Adv Genet.* 94:251-85, 2016.
- MARTINS, J. R & CORRÊA, B. L. Babesiose e anaplasmoses bovina: aspectos destas enfermidades. *Pesq. Agrop. Gaúcha*, Porto Alegre, v.1, n.1, p.51-58, 1995
- MARTINS, J. R. Carrapato bovino: epidemiologia e controle. *Cad. Boas Prát. Prod*, 115-136, 2004.
- MATSKEVICH, A.A., QUINTIN, J., & FERRANDON, D. The *Drosophila* PRR GGBP3 assembles effector complexes involved in anti fungal defenses independently of its Toll pathway activation function. *European Journal of Immunology*, 40, 1244 e 1254, 2010.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *In: Controle Biológico - volume 1*. EMBRAPA: Jaguariúna – SP, 262 p. 1998.
- MEYLING, N.V., LUBECK, M., BUCKLEY, E.P., EILENBERG, J., REHNER, S.A. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology* 18, 1282–1293, 2009.
- MEYLING, N.V. & EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*. 43:145–155, 2007.
- MILLER, R.J., DAVEY, R.B., GEORGE, J.E. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J.Med.Entomol.* 36, 533-538, 1999.
- MORGAN, J.A., CORLEY, S.W., JACKSON, L.A., LEW-TABOR, A.E., MOOLHUIJZEN, P.M., JONSSON, N.N. Identification of a mutation in the para sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricides. *Int. J. Parasitol.* 39, 775-779, 2009.
- MULLER, U., VOGEL, P., ALBER, G., & SCHAUB, G.A. The innate immune system of mammals and insects. *Contributions to Microbiology*, 15, 21 e 44, 2008.
- MURRELL, A.; CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S. C. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v. 21, p. 244-258, 2001.
- NOLAN, J., J. T. WILSON, P. E. GREEN, AND P. E. BIRD. Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Aust. Vet J.* 66:179-182, 1989.
- ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; BARROS, N.M. & AZEVEDO JL. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *American Journal of Veterinary Research*, 62: 1478-1480, 2001.
- ORTIZ-URQUIZA, A., & KEYHANI, N.O. Stress response signaling and virulence: insights from entomopathogenic fungi. *Current Genetics*, 61, 239 e 249, 2015.
- PELL, J.K.; EILENBERG, J.; HAJK, A. E. & STEINKRAUS DC. Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. In: BUTT TM, JACKSON C, MAGAN N (Eds.) *Fungal as biocontrol agents: progress, problems and potential*. *CAB International, Wallingford*, p. 77-153, 2001.
- PENG, G.X., & XIA, Y.X. Expression of scorpion toxin LqhIT2 increases the virulence of *Metarhizium acridum* towards *Locusta migratoria manilensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(11), 1659 e 1666, 2014.
- PEREIRA, L.S.; OLIVEIRA, P.L.; BARJA-FIDALGO, C.; DAFFRE, S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental Parasitology*, v. 99, n. 2, p. 66-72, 2001.

- PEREIRA, M. C. & LABRUNA, M. B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Pereira, M.C.; Labruna, M.B.; Szabó, M.J.P.; Klafke, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus – Biologia, controle e resistência*. MedVet Livros, São Paulo, p. 15-56, 2009
- PERINOTTO, W.M.S., ANGELO, I.C., GOLO, P.S., CAMARGO, M.G., QUINELATO, S., SANTI, L., VAINSTEIN, M.H., BEYS-DA-SILVA, W.O., SALLES, C.M.C., BITTENCOURT, V.R.E.P.,. *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae) Pr1 activity: biochemical marker of fungal virulence in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 24, 123–132. 2014.
- POHL, P. C.; KLAFFKE, G. M.; JÚNIOR, J. R.; MARTINS, J. R.; DA SILVA VAZ, I. JR., MASUDA, A.. ABC transporters as a multidrug detoxification mechanism in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res.* 111(6):2345-51, 2012.
- POLAR, P.; KAIRO, M. T, MOORE, D.; PEGRAM, R. & JOHN SA. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathologia*, 160: 151-157, 2005.
- PRUETT, J.H., GUERRERO, F.D., HERNANDEZ, R. Isolation and identification of an esterase from a Mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Econ. Entomol.* 95, 1001-1007, 2002.
- RANGEL, D.E., ALSTON, D.G., & ROBERTS, D.W. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycological Research*, 112,1355e1361, 2008.
- RECK J, KLAFFKE GM, WEBSTER A, DALL'AGNOL B, SCHEFFER R, SOUZA UA, CORASSINI VB, VARGAS R, DOS SANTOS JS, MARTINS JR. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet Parasitol.* Mar 17;201(1-2):128-36, 2014 a
- RECK J, MARKS FS, RODRIGUES RO, SOUZA UA, WEBSTER A, LEITE RC, GONZALES JC, KLAFFKE GM, MARTINS JR. Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? *Prev Vet Med.* Jan 1;113(1):59-62, 2014b.
- RECK, JR.; BERGER, M.; TERRA, R. M. S.; MARKS, F. S.; DA SILVA, VAZ. J.R, I.; GUIMARÃES, J. A. & TERMIGNONI, C. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Research in Veterinary Science*, 86, 56–62, 2009.
- ROBERTS, D.W., & ST LEGER, R.J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 1 e 70, 2004.
- ROBERTS, D.W., HUMBER, R.A., Entomogenous fungi. In: Cole, G.T., Kendrick, W.B. (Eds.), vol. 2. Academic Press, New York, pp. 201–236, 1981.
- SAFAVI, S.A. Successive subculturing alters spore-bound Pr1 activity, germination and virulence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, 21, 883 e 890, 2011.
- SANTI, L.; SILVA, L. A. D., BEYS-DA-SILVA, W. O.; CORRÊA, A. P. F., RANGEL, D. E. N.; CARLINI, C. R.; SCHRANK. A. & VAINSTEIN, M.H. Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus*. *World J Microbiol Biotechnol*, 27:2297–303, 2011.
- SANTI, L.; SILVA, W. O., PINTO, A. F., SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biol*, 114(4):312, 2010.

- SCHNITZERLING, H. J., J. NOLAN, AND S. HUGHES. Toxicology and metabolism of some synthetic pyrethroids in larvae of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Pestic. Sci.* 14:64-72, 1983.
- SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56, 1267-1274, 2010.
- SHAH, P. A. & PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotech*, 61: 413–423, 2003.
- SCHUMACHER, V. & POEHLING, H.M.,. *In vitro* effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Biol.* 116, 121–132, 2012.
- SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal). Compêndio de Produtos Veterinários SINDAN. 2017. Disponível em: <http://www.cpv.com.br/cpv/index.html>
- SILVA W. O., SANTI L., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A. Biocontrol of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* by the acaricidal fungus *Metarhizium anisopliae*. In: Woldemeskel M (editor). *Ticks: Disease, Management and Control*. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers Inc., 217–46, 2012.
- SONENSHINE DE, MACALUSO KR. Microbial Invasion vs. Tick Immune Regulation. *Front Cell Infect Microbiol.* Sep 5;7:390, 2017.
- SONG, T.T., & FENG, M.G. In vivo passages of heterologous *Beauveria bassiana* isolates improve conidial surface properties and pathogenicity to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 106, 211 e 216, 2011.
- ST LEGER, R. J, COOPER, R. M. & CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 48: 85-95, 1986.
- ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M. & CHARNLEY, A. K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.* 58:415-426, 1991.
- ST.LEGER, R.J.,WANG, C., & FANG, W. New perspectives on insect pathogens. *Fungal Biology Reviews*, 25, 84 e 88, 2011.
- STAATS, C. C.; KMETZSCH, L.; LUBECK, I.; JUNGES, A.; VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Biol.* 117(2):137-44, 2013.
- STONE NE, OLAFSON PU, DAVEY RB, BUCKMEIER G, BODINE D, SIDAK-LOFTIS LC, GILES JR, DUHAIME R, MILLER RJ, MOSQUEDA J, SCOLES GA, WAGNER DM, BUSCH JD. Multiple mutations in the para-sodium channel gene are associated with pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus* from the United States and Mexico. *Parasit Vectors.* Oct 1;7:456, 2014.
- STRAND, M.R. The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15, 1 e 14, 2008.
- TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasiticides. *Vet J.* 161:253-268, 2001.
- THOMAS, M.B., & READ A.F. Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews. Microbiology*, 5(5), 377–383, 2007.
- VALANNE, S., WANG, J.H., & REAMET, M. The *Drosophila* Toll signaling pathway. *Journal of Immunology*, 186, 649 e 656, 2011.
- VEGA, F.E., GOETTEL, M.S., BLACKWELL, M., CHANDLER, D., JACKSON, M.A., KELLER, S. ROY, H.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2, 149 e 159, 2009.

- VIDAL C., FARGUES J. Climatic constraints for fungal bioinsecticides, pp. 39–55. In Ekesi S., Maniania N. K., editors. (eds.), Use of entomopathogenic fungi in biological pest management. Research Signpost Inc., Kerala, 2007.
- VIJVERBERG, H. P., J. M. VAN DER ZALM, AND J. VAN DER BERCKEN. Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. *Nature* 295:601-603, 1982.
- WAGO, H. Host defense reactions of insects. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zoo*, 39: 1– 4 In Japanese with English summary. 1995
- WANG, C., & ST LEGER, R.J. A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. *Nature Biotechnology*, 25, 1455 e 1456, 2007.
- WEBSTER A, RECK J, SANTI L, SOUZA UA, DALL'AGNOL B, KLAFKE GM, BEYSDA-SILVA WO, MARTINS JR, SCHRANK A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Vet Parasitol.* Jan 30;207(3-4):302-8, 2015.
- ZHIOUA, E.; BOWING, M.; JONHSON, P. W.; GINSESBERG, H. S. & LEBRUM RA. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology*, 83: 815-818, 1997.

7. ANEXOS

7.1 Currículo lattes

Dados pessoais

Nome Anelise Webster de Moura Vieira Araújo
Nascimento 11/01/1986 - Porto Alegre/RS - Brasil
CPF 059.787.704-17

Formação acadêmica/titulação

2013 Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: MECANISMOS DE INTERAÇÃO DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus*
COM O FUNGO ACAROPATOGENICO *Metarhizium anisopliae*
Orientador: Augusto Schrank
Co-orientador: Guilherme Marcondes Klafke
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2011 - 2013 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: EFEITO DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* EM ASSOCIAÇÃO OU NÃO A
ACARICIDA SOBRE CEPA DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus* RESISTENTE A
ACARICIDAS: ENSAIOS EM LABORATÓRIO E A CAMPO, Ano de obtenção: 2013
Orientador: Augusto Schrank
Co-orientador: João Ricardo de Souza Martins
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2005 - 2009 Graduação em Medicina Veterinária.
Centro de Estudos Superiores de Maceió, CESMAC, Maceio, Brasil
Título: Uso de Neem (*Azadirachta indica*), Melão de São Caetano (*Mormodica charantia*) e
semente de abóbora (*Curcubita moschata*) no controle de helmintos gastrintestinais de ovinos
naturalmente infectados.
Orientador: Silvio Romero de Oliveira Abreu

Formação complementar

2016 - 2016 Curso de curta duração em I SEMINÁRIO DO MERCOSUL SOBRE
ESCABIOSE, MIÍASE, PEDICULOSE E TUNGÍASE. (Carga horária: 16h). Universidade
do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, Sao Leopoldo, Brasil

2014 - 2014 Curso de curta duração em Caracterização metagenômica. (Carga horária:
15h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

2013 - 2013 Curso de curta duração em Taxonomia Y Bioecologia de artrópodes parasitos.
(Carga horária: 40h). Universidad Nacional de Tucumán, UNT-IML, Argentina

2012 - 2012 Curso de curta duração em ALIMENTOS. O que você gostaria de saber a
ciência. (Carga horária: 90h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto
Alegre, Brasil

2012 - 2012 Curso de curta duração em Cuidados e manejo de animais de experimentação.
(Carga horária: 25h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto
Alegre, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Biossegurança no IPVDF: Fundamentos e Aplicações. (Carga horária: 2h). Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, IPVDF, Brasil

2010 - 2010 Diagnóstico e Controle de Brucelose e Tuberculose. (Carga horária: 40h). Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, IPVDF, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Carrapatos - Biologia, Epidemiologia e Controle. (Carga horária: 24h). Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, IPVDF, Brasil

2009 - 2009 Curso de curta duração em Ciclo de Palestras de Medicina Veterinária. (Carga horária: 5h). Centro de Estudos Superiores de Maceió, CESMAC, Brasil

2009 - 2009 Curso de curta duração em Dermatologia em Cães e Gatos. (Carga horária: 20h). Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceio, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Emergências em Clínica de Pequenos Animais. (Carga horária: 20h). Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceio, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Comportamento Animal.. (Carga horária: 10h). Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceio, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Neurologia Veterinária. (Carga horária: 8h). Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceio, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Ultrassonografia em Pequenos animais. (Carga horária: 8h). Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Dermatologia Veterinária. (Carga horária: 8h). Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceio, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Medicina de Felinos. (Carga horária: 10h). Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceio, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Dermatologia. (Carga horária: 13h). Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Alagoas, CRMV/AL, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Cardiologia Veterinária. (Carga horária: 10h). Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceio, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Nutrição Clínica em Pequenos Animais. (Carga horária: 10h). Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceio, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Emergência em Clínica de Pequenos Animais. (Carga horária: 16h). Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Alagoas, CRMV/AL, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Avaliação Andrológica de Mamíferos Domésticos. (Carga horária: 12h). Centro de Estudos Superiores de Maceió, CESMAC, Maceio, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Emergências Veterinárias. (Carga horária: 12h). Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceio, Brasil

Atuação profissional

1. Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária - FEPAGRO

Vínculo institucional

2009 - 2010 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

2. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor - IPVDF

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

3. Centro de Estudos Superiores de Maceió – CESMAC Vínculo institucional

2006 - 2008 Vínculo: Livre, Enquadramento funcional: Estágio extra-curricular, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Estágio extra-curricular nos laboratórios de Microbiologia, Parasitologia e Patologia Clínica

4. Secretaria Municipal de Saúde de Maceió – SMS Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Vacinador , Carga horária: 8, Regime: Parcial

Revisor de periódico

1. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine

Vínculo

2016 - Atual Regime: Parcial

2. Ciência Rural (UFSM. Impresso)

Vínculo

2015 - Atual Regime: Parcial

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. DALL'AGNOL, BRUNO; MICHEL, THAÍS; WECK, BÁRBARA; SOUZA, UGO ARAÚJO; WEBSTER, ANELISE; LEAL, BRUNA FERREIRA; KLAFKE, GUILHERME MARCONDES; Martins, João Ricardo; OTT, RICARDO; VENZAL, JOSÉ MANUEL; FERREIRA, CARLOS ALEXANDRE SANCHEZ; RECK, JOSÉ

Borrelia burgdorferi sensu lato in *Ixodes longiscutatus* ticks from Brazilian Pampa. Ticks and Tick-Borne Diseases. Fator de Impacto(2016 JCR): 3,2300, v.8, p.928 - 932, 2017.

2. DALL'AGNOL, BRUNO; SOUZA, UGO; WEBSTER, ANELISE; WECK, BÁRBARA; STENZEL, BÁRBARA; LABRUNA, MARCELO; KLAFKE, GUILHERME; MARTINS, JOÃO RICARDO; FERREIRA, CARLOS ALEXANDRE SANCHEZ; RECK, JOSÉ

Candidatus Rickettsia aseboensis- in *Rhipicephalus sanguineus* ticks, Brazil. ACTA TROPICA. Fator de Impacto (2016 JCR): 2,2180, v.167, p.18 - 20, 2017.

3- SOUZA, UGO; DALL'AGNOL, BRUNO; MICHEL, THAIS; WEBSTER, ANELISE; KLAFKE, GUILHERME; Martins, João Ricardo; KASPER, CARLOS BENHUR; TRIGO, TATIANE CAMPOS; OTT, RICARDO; MARIA DE ASSIS JARDIM, MÁRCIA; Reck, José

Detection of *Bartonella* sp. In deer louse flies (*Lipoptena mazamae*) on gray brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in the neotropics. Journal of zoo and wildlife medicine. Fator de Impacto(2016 JCR): 0,5900, v.48, p.532 - 535, 2017.

4. WEBSTER, ANELISE; PRADEL, ENDRIGO; SOUZA, UGO ARAÚJO; Martins, João Ricardo; Reck, José; SCHRANK, AUGUSTO; KLAFKE, GUILHERME

Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated?. Ticks and Tick-borne Diseases. Fator de Impacto(2016 JCR): 3,2300, v.8, p.270 - 274, 2017.

5. KLAFKE, GUILHERME; WEBSTER, ANELISE; AGNOL, BRUNO DALL; PRADEL, ENDRIGO; SILVA, JENIFFER; DE LA CANAL, LUIZ HENRIQUE; BECKER, MARCELO; OSÓRIO, MATEUS FELIPE; MANSSON, MELANIE; BARRETO, RAFAEL; SCHEFFER, RAMON; SOUZA, UGO ARAÚJO; CORASSINI, VIVIAN BAMBERG; DOS SANTOS, JULSAN; RECK, JOSÉ; MARTINS, JOÃO RICARDO

Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. Ticks and Tick-borne Diseases. Fator de Impacto(2016 JCR): 3,2300, v.8, p.73 - 80, 2016.

6. WECK, BÁRBARA; DALL'AGNOL, BRUNO; SOUZA, UGO; WEBSTER, ANELISE; STENZEL, BARBARA; KLAFKE, GUILHERME; MARTINS, JOÃO RICARDO; RECK, JOSÉ

Spotted Fever Group *Rickettsia* in the Pampa Biome, Brazil, 2015-2016. Emerging Infectious Diseases (Online). Fator de Impacto(2016 JCR): 8,2220, v.22, p.2014 – 2016.

7. WEBSTER, A; RECK, JOSÉ; SANTI, LUCÉLIA; SOUZA, U. A.; DALL'AGNOL, BRUNO; KLAFKE, GUILHERME M.; BEYS-DA-SILVA, WALTER O.; MARTINS, JOÃO RICARDO; SCHRANK, AUGUSTO

Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. Veterinary Parasitology (Print). Fator de Impacto (2016 JCR): 2,3560, v.207, p.302 - 308, 2015.

8. RECK, JOSÉ; MARKS, FERNANDA S.; RODRIGUES, R. O.; SOUZA, U. A.; WEBSTER, A; LEITE, ROMARIO C.; GONZALES, J. C.; KLAFKE, G. M.; MARTINS, J. R.

Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle?. Preventive Veterinary Medicine (Print). Fator de Impacto (2016 JCR): 1,9870, v.113, p.59 - 62, 2014.

9. RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A; Bruno Dall'Agnol; SCHAEFER, R.; SOUZA, U. A.; CORRASSINI, V.; VARGAS, R.; SILVEIRA, J.; MARTINS, J. R.

First report of fluzuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. Veterinary Parasitology (Print). Fator de Impacto (2016 JCR): 2,3560, v.201, p.128 - 136, 2014.

10. MARTINS, J. R., ANTUNES, D. F., ROVAINA LOUREANO DOYLE, SOUZA, U.A, WEBSTER, A, CRUZ, N. L. N.

Avaliação de formulações de doramectina injetável no controle de miíase natural por *Cochliomyia hominivorax* em bovinos submetidos à castração. *A HoraVeterinária*, v.189, p.7-10 - 2012.

11. MARTINS, J. R., MARTINS, J. R., RECK JR., J., DOYLE, R. L., VIEIRA, A. W. M., VIEIRA, A. W. M.

Amblyomma aureolatum (Acari: Ixodidae) parasitizing margay (*Leopardus w iedii*) in Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso)*. v.19, p.189 - 191, 2010.

12. CRUZ, N. L. N., VIEIRA, A. W. M., PORTO, W. J. N., SOUTOMAIOR, M. P., ABREU, S.R.O

Infecção por *Babesia canis* em cães provenientes do município de Marechal Deodoro - AL. *Revista Semente*. , v.4, p.167 - 173, 2009.

13. AUTO, M. C., LOPES, A. C. P. A., VIEIRA, A. W. M., CRUZ, N. L. N., ROCHA, T. J. M., PORTO, W. J. N., SOUTOMAIOR, M. P.

14. Demodicose Canina: Aspectos clínicos e parasitológicos. *Revista Semente*. , v.3, p.115 - 118, 2008.

15. AUTO, M. C., ROCHA, T. J. M., VIEIRA, A. W. M., LOPES, A. C. P. A., CRUZ, N. L. N., PORTO, W. J. N., SOUTOMAIOR, M. P.

Fauna ectoparasitária de cães naturalmente infestados provenientes do Município de Marechal Deodoro- AL. *Revista Semente*. v.3, p.147 - 149, 2008.