

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

Avaliação dos perfis protéico e lipídico na resposta de *Rhipicephalus*
microplus à infecção com fungos.

Isabele da Costa Angelo

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DOS PERFIS PROTÉICO E LIPÍDICO NA RESPOSTA
DE *Rhipicephalus microplus* À INFECCÃO COM FUNGOS.**

ISABELE DA COSTA ANGELO

Sob a Orientação da Professora
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt
E sob a co-orientação da Professora
Evelize Folly das Chagas
E sob a co-orientação do Professor
Emerson Guedes Pontes

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ

Março de 2011

595.42

A584a

T

Angelo, Isabele da Costa, 1981-
Avaliação dos perfis protéico e
lipídico na resposta de
Rhipicephalus microplus à infecção
com fungos / Isabele da Costa Angelo
- 2011.

141 f.

Orientador: Vânia Rita Elias
Pinheiro Bittencourt.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Bibliografia: f. 92-108

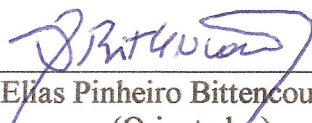
1. Carrapato - Controle
biológico - Teses. 2. Rhipicephalus
- Teses. 3. Carrapato - Metabolismo
- Teses. I. Bittencourt, Vânia Rita
Elias Pinheiro, 1959-. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias. III.
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ISABELE DA COSTA ANGELO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

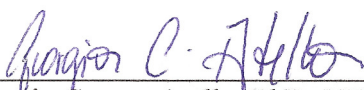
TESE APROVADA EM 03/03/2011.



Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt, PhD, UFRRJ.
(Orientador)



Everton Kort Kamp Fernandes, DSc, UFG.



Georgia Correa Atella, PhD, UFRJ.



Márcia Regina Soares da Silva, PhD, UFRJ.



Pedro Lagerblad de Oliveira, PhD, UFRJ

*Dedico este trabalho a minha grande família: meu
esposo Huarrisson, meu filho Pedro, meus pais
Josemar e Maria de Fátima, meus irmãos Leonardo,
Josemar Junior e Dafni e meus pequenos João
Pedro, Giovanna, Gabriel e Maria Eduarda.*

Amo vocês.

*“Aqueles que amamos nunca morrem,
apenas partem antes de nós.”*

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Senhor! Esteja à minha frente para me iluminar! Esteja atrás para me proteger! Esteja ao meu lado para me amparar! Amém! Obrigada Senhor por ter me permitido concluir este trabalho, mesmo com todos os obstáculos e perdas irreparáveis de pessoas que tanto amava e amarei por toda a vida, meus amados avós, *Florival Angelo* e *Francisca Valentina Angelo*, e minha querida tia *Marli Lúcia Maria da Costa*. Obrigada por ter me presenteado com uma família maravilhosa, meu esposo *Huarrisson Azevedo Santos* e meu tão pequeno e amado filho *Pedro Angelo Santos*; vocês deram um novo sentido a minha vida, amo vocês. Agradeço a professora *Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt* por ter compartilhado todo seu conhecimento e sabedoria, pela confiança e principalmente pela amizade durante todos esses anos; a minha grande família: meus pais, *Josemar Angelo* e *Maria de Fátima da Costa Angelo*, meus avós, *Florival Angelo (in memoriam)* e *Francisca Valentina Angelo (in memoriam)*; meus irmãos *Leonardo da Costa Angelo*, *Josemar Angelo Junior* e *Dafni Ramos Conceição*; meus queridos *Gabriel Eduardo da Costa Amâncio*, *Sandro Henrique da Costa Amâncio* e *Verônica Camilo de Santana Amâncio*; minha cunhada *Isabelle Abreu de Souza Angelo* e ao meu pequeno “branco de neve” *João Pedro de Souza Angelo*; a todos os meus familiares: tios, tias, primos e primas... vocês estão no meu coração; a grande amiga *Ana Paula Rodrigues de Moraes Badini*, que me acompanha pessoalmente e profissionalmente desde o início da graduação, compartilhando minhas alegrias e tristezas; a querida amiga *Patrícia Silva Gôlo* que foi o meu braço direito em todas as etapas da realização deste trabalho, além de estar sempre presente na vida pessoal...clins, você é muito especial; aos queridos amigos *Mariana Guedes Camargo* e *Wendell Marcelo de Souza Perinotto* pela amizade e dedicação, sempre me ajudando a realizar os experimentos, os quais sempre dizia “- esse será o último”, mas nunca era; amigos, amo vocês!!!!; a querida *Margarida Alves de Souza*, por cuidar tão bem da minha família, principalmente do Pedro; ao grande amigo *Éverton Kort Kamp Fernandes* que mesmo a distância participou e contribuiu com minha formação profissional; aos amigos *Marcos Pinheiro Franque* e *Usha Vashist* por estarem ao meu lado em momentos tão difíceis; a querida amiga *Andréia Loureiro Musso Terra* que sempre me incentivou e acreditou no meu potencial; aos colegas de laboratório *George Eduardo Gabriel Kluck*, *Fillipe Araujo de Sá*, *Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues* e *Jôsie Marcele Lira Albuquerque* pelos muitos momentos de coleta de hemolinfa; a professora *Evelize Folly das Chagas* e ao professor *Emerson Guedes Pontes* pela co-orientação e ensinamentos; aos professores *Pedro Lagerblad de Oliveira*, *Georgia Correa Atella* e *Márcia Regina Soares da Silva* sempre muito solícitos e exímios colaboradores deste trabalho; ao querido professor *Carlos Luiz Massard*, pela amizade construída ao longo desses anos; ao professor *Hatisaburo Masuda* por ter permitido a utilização de um dos equipamentos necessários para execução deste trabalho e a *Heloísa Souza Lima* pelo apoio técnico durante as corridas cromatográficas; as colegas *Isabele*, *Luciana Gomes* e *Fabiana*, pela ajuda na realização dos géis bidimensionais; a todos os funcionários da Estação Experimental W. O. Neitz que contribuíram para a manutenção dos animais nos estábulos; a CAPES pelo auxílio financeiro que foi primordial para a execução deste trabalho e aos colegas e professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

BIOGRAFIA

Isabele da Costa Angelo, filha de Josemar Angelo e Maria de Fátima da Costa Angelo, nasceu em 12 de junho de 1981, na cidade do Rio de Janeiro – RJ.

Cursou o ensino fundamental no Colégio Peri, sendo o último ano na Escola Municipal Dr. Jair Tavares de Oliveira, ambos no município do Rio de Janeiro, tendo concluído em dezembro de 1994. Em 1995, ingressou no ensino médio no Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - CTUR, em Seropédica, concluindo o curso técnico em Agropecuária em dezembro de 1997.

Em setembro de 1999 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído em outubro de 2004. Durante esses anos foi estagiária na Clínica Veterinária Andresa, em Campo Grande, RJ; no Departamento de Reprodução Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e no Laboratório de Controle Microbiano da mesma instituição. Foi, pelo período de um ano, bolsista de Iniciação Científica PIBIC-CNPq, apresentando trabalhos em congressos e simpósios, e publicou dois trabalhos científicos em periódico indexado.

Em março de 2005 foi aprovada no processo de seleção ao nível de Mestrado, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Apresentou seis trabalhos em congressos nacionais, concluindo em 2007.

Neste mesmo ano, ingressou no Doutorado, no mesmo curso de Pós-Graduação. Ministrou aulas de Parasitologia Veterinária para alunos de graduação em Medicina Veterinária a convite de professores do Departamento de Parasitologia Animal, e como estagiário docente, além de diversas aulas na disciplina de Controle Biológico no Curso de Pós-Graduação da mesma instituição. Durante o Doutorado, participou de congressos nacionais e internacionais nos quais 47 trabalhos foram apresentados. Em 2010, publicou o primeiro artigo oriundo da tese de Doutorado, intitulado: Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi, no periódico *Transboundary and Emerging Diseases*. O total de sete artigos científicos foram publicados em periódicos nacionais e internacionais, e um manuscrito está submetido à “*Veterinary Parasitology*”, atualmente sob revisão.

RESUMO

ANGELO, Isabele da Costa. **Avaliação dos perfis protéico e lipídico na resposta de *Rhipicephalus microplus* à infecção com fungos** 2011. 120p. Tese (Doutorado em Ciências, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O trabalho avaliou os perfis protéico e lipídico de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após infecção com *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Os tratamentos foram imersão ou inoculação da suspensão conidial em *R. microplus*. A hemolinfa foi coletada 24 e 48 horas após os tratamentos. O plasma foi separado dos hemócitos por centrifugação e os hemócitos resuspenso em tampão fosfato pH 7,2. A concentração de proteína total foi determinada em ambas as frações da hemolinfa e os hemócitos quantificados. O plasma da hemolinfa foi filtrado em membrana de 100 kDa e 10 kDa, sendo analisados por eletroforese e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O proteoma do plasma da hemolinfa (tratamento por inoculação) foi avaliado por gel 2D. Foram observadas variações na quantidade de proteína total de ambas as frações da hemolinfa, na quantidade de hemócitos bem como na intensidade de proteínas/peptídeos expressos no plasma da hemolinfa. Nos hemócitos, os entomopatógenos reduziram a quantidade de serpinas, enquanto *F. oxysporum* causou aumento. No gel 2D foram observadas variações na expressão bem como na ausência/presença de proteínas entre os grupos. O plasma da hemolinfa teve sua atividade antimicrobiana testada contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e contra o fungo utilizado no tratamento das fêmeas ingurgitadas. A hemolinfa coletada 48 horas após o tratamento por imersão com *B. bassiana* apresentou atividade anti-*B. bassiana* com 48 horas de avaliação. Esta hemolinfa foi submetida à coluna Superose de CLAE e o pico coletado analisado na coluna analítica C18. As frações coletadas da C18 apresentaram atividade anti-*B. bassiana*, porém não apresentaram atividade contra *Candida albicans*. Essas frações foram analisadas por Maldi-Tof e a maioria delas apresentou um íon com razão m/z 1.119,5; no entanto, outros íons podem estar envolvidos com essa atividade antimicrobiana. Os lipídeos presentes no plasma da hemolinfa, nos hemócitos e no corpo gorduroso foram extraídos e analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) ou CCD de alta performance para lipídeos neutros e fosfolipídeos. As classes de lipídeos neutros encontradas no plasma da hemolinfa foram colesterol-éster, colesterol (CHO) e ácidos graxos (AG), que sofreram alterações em função do fungo utilizado, tipo de tratamento e tempo de observação. Os fosfolipídeos encontrados foram fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, que não foram significativamente alterados após a infecção fúngica. Nos hemócitos, as mesmas classes de lipídeos foram encontradas e *B. bassiana* alterou os fosfolipídeos, enquanto *M. anisopliae* s.l. alterou os AG e CHO. O corpo gorduroso apresentou, além destas classes de lipídeos neutros, o triacilglicerol, que aumentou significativamente 48 horas após a inoculação com *M. anisopliae* s.l. A atividade lipase no corpo gorduroso foi mensurada, sendo evidenciado um aumento 48 horas após a inoculação, principalmente no grupo inoculado com *Metarhizium*. Portanto, os resultados demonstraram alterações na expressão de proteínas no plasma da hemolinfa e nos hemócitos após inoculação com os fungos, imunossupressão dos hemócitos, indução de peptídeos com atividade antimicrobiana após infecção com *B. bassiana*, além de alterações no perfil lipídico de *R. microplus* após infecção. No entanto, maiores estudos são necessários para o entendimento dessas alterações.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos; Controle biológico; metabolismo lipídico

ABSTRACT

ANGELO, Isabele da Costa. **Evaluation of protein and lipid profile in response of *Rhipicephalus microplus* to infection by fungi**. 2011. 120p. Tese (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The study evaluated the protein and lipid profiles of *Rhipicephalus microplus* engorged females after infection by *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Fusarium oxysporum*. The treatments were immersion or inoculation of conidial suspension in *R. microplus*. The hemolymph was collected 24 and 48 hours after treatment. The cell-free hemolymph was separated of hemocytes by centrifugation and hemocytes resuspended in phosphate buffer pH 7.2. The amount of total protein was determined in both fractions of hemolymph and hemocytes were quantified. The cell-free hemolymph was filtered through a 100 kDa and 10 kDa membranes, and analyzed by electrophoresis and liquid chromatography (HPLC). The proteome of cell-free hemolymph (treatment by injection) was evaluated by 2D-PAGE. Changes were observed in amount total protein and the amount of hemocytes, but no difference was observed in the electrophoretic profile (1D-PAGE) of the cell-free hemolymph. In haemocytes, the entomopathogens reduced the amount of serpins, while *F. oxysporum* caused increased. In 2D-PAGE variations were observed in both expression and presence/absence of protein between the groups. The cell-free hemolymph antimicrobial activity was tested against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and against the fungus used in the treatment of engorged ticks. The hemolymph collected 48 hours after the immersion treatment with *B. bassiana* presented activity anti-*B. bassiana* with 48 hours of evaluation. This hemolymph was subjected to Superose column to HPLC and peak was collected and analyzed on the analytical column C18. The fractions were collected from the C18 and its presented activity anti-*B. bassiana*, but showed no activity against *Candida albicans*. These fractions were analyzed by MalDI-Tof and most of them had in common an ion with m/z 1,119.5; however, other ions may be involved with this activity antimicrobial. The lipids present in cell-free hemolymph, in the hemocyte and fat body were extracted and analyzed by thin layer chromatography (TLC) or HPTLC for neutral lipids and phospholipids. The classes of neutral lipids in the cell-free hemolymph were cholesterol ester, cholesterol (CHO) and fatty acids (FA), which have varied depending on the fungus used, type of treatment and observation time. Phospholipids found were phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, its were not significantly altered after the fungal infection. In hemocytes, the same classes of lipids were found and *B. bassiana* modified phospholipids, while *M. anisopliae* s.l. altered FA and CHO. The fat body showed, in addition to these classes of neutral lipids, the triglycerides, which increased significantly 48 hours after inoculation with *M. anisopliae* s.l. The lipase activity in fat body was measured and it was demonstrated that increased activity 48 hours after inoculation, mainly in the group inoculated with *Metarhizium*. Therefore, the results showed alterations related to the proteins expression in the hemocytes and the cell-free hemolymph after inoculation with fungi, immunosuppression of hemocytes and antimicrobial peptides induction after infection with *B. bassiana*, besides changes in the lipid profile of *R. microplus* after infection. However, further studies are necessary to understand these changes.

Key word: Antimicrobial peptides, biological control, lipid metabolism

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*. Fase de vida parasitária: inicia-se com a fixação das larvas infestantes no hospedeiro; após as ecdises, as larvas mudam para ninfas, e as ninfas mudam para adultos sobre o hospedeiro. Após o completo ingurgitamento, as fêmeas caem ao solo, iniciam a postura e há eclosão das larvas no ambiente (fase de vida livre)..... 3
- Figura 2.** Material utilizado na coleta da hemolinfa. A: fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus microplus*; B: seringa ultrafina BD® utilizada para perfuração da cutícula; C: capilar de vidro acoplado a uma borracha flexível utilizado na coleta da hemolinfa..... 20
- Figura 3.** Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após o tratamento por imersão. A-D: quarto dia após o tratamento. A: grupo controle; B: grupo tratado com *Metarhizium anisopliae* s.l.; C: grupo tratado com *Beauveria bassiana*; D: grupo tratado com *Fusarium oxysporum*. E-H: oitavo dia após o tratamento. E: grupo controle; F: grupo tratado com *Metarhizium anisopliae* s.l.; G: grupo tratado com *Beauveria bassiana*; H: grupo tratado com *Fusarium oxysporum*..... 32
- Figura 4.** Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após o tratamento por inoculação A-E: quarto dia após o tratamento. A: grupo picado; B: grupo inoculado com água destilada estéril e Tween 80 0,1%; C: grupo inoculado com *Metarhizium anisopliae* s.l.; D: grupo inoculado com *Beauveria bassiana*; E: grupo inoculado com *Fusarium oxysporum*. F-J: oitavo dia após o tratamento. F: grupo picado; G: grupo inoculado com água destilada estéril e Tween 80 0,1%; H: grupo inoculado com *Metarhizium anisopliae* s.l.; I: grupo inoculado com *Beauveria bassiana*; J: grupo inoculado com *Fusarium oxysporum*..... 33
- Figura 5.** Etapas da coleta de hemolinfa. A: saída da hemolinfa após perfuração da cutícula com agulha ultrafina; B: coleta da hemolinfa com auxílio de capilar de vidro; C: hemolinfa no interior do capilar de vidro..... 34
- Figura 6.** Comparação de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos diferentes grupos utilizados para coleta de hemolinfa 48 horas após o tratamento por inoculação. A: controle; B: controle inoculado com água destilada estéril e Tween 80 0,1%; C: inoculado com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l.; D: *Beauveria bassiana*; E: *Fusarium oxysporum*. As fêmeas representadas nas figuras C e E mostram-se intumescidas..... 34
- Figura 7.** Comparação dos tecidos internos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* 48 horas após o tratamento por inoculação. A: controle inoculado com água destilada estéril e Tween 80 0,1%; B: inoculação com *Metarhizium anisopliae* s.l.; C: *Fusarium oxysporum*. Dissecção realizada 48 horas após a inoculação..... 34
- Figura 8.** Concentração de proteína total do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o

tratamento por imersão em suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Cada grupo continha 90 fêmeas.....	35
Figura 9. Concentração de proteína total do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por inoculação da suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Cada grupo continha 90 fêmeas.....	36
Figura 10. Concentração de proteína total dos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão em suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Cada grupo continha 90 fêmeas.....	37
Figura 11. Concentração de proteína total dos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por inoculação da suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Cada grupo continha 90 fêmeas.....	38
Figura 12. Concentração de proteína total do corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por inoculação da suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Cada grupo continha 90 fêmeas.....	39
Figura 13. Quantificação dos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão em suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Cada grupo continha 90 fêmeas.....	40
Figura 14. Quantificação dos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão em suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Cada grupo continha 90 fêmeas.....	41
Figura 15. SDS-PAGE 10% do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> . Hemolinfa coletada 24 e 48 horas após tratamento por imersão ou inoculação com <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Em destaque, as alterações observadas na intensidade da expressão da proteína com peso molecular próximo a 55 kDa e do peptídeo com peso molecular próximo a 6 kDa. Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com Coomassie Coloidal.....	42
Figura 16. SDS-PAGE 15% de plasma da hemolinfa de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. por imersão ou inoculação. Hemolinfa coletada 24 e 48 horas após o tratamento por imersão ou inoculação com <i>Metarhizium anisopliae</i> para confirmação das bandas com peso molecular de aproximadamente 6 kDa. Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com Coomassie Coloidal.....	43

Figura 17. Gel nativo 15% de proteínas do plasma da hemolinfa menor que 100 kDa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> . Hemolinfa coletada 24 e 48 horas após tratamento por imersão ou inoculação com <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Coloração realizada com nitrato de prata.....	44
Figura 18. SDS-PAGE 10% de proteínas do plasma da hemolinfa menor que 100 kDa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> . Hemolinfa coletada 24 e 48 horas após tratamento por imersão ou inoculação com <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com Coomassie Brilhante Blue.....	45
Figura 19. SDS-PAGE 15% de proteínas do plasma da hemolinfa menor que 100 kDa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> . A hemolinfa foi coletada 24 e 48 horas após tratamento por imersão ou inoculação com <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com nitrato de prata.....	46
Figura 20. SDS-PAGE 12% de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletados 24 e 48 horas após tratamento por imersão ou inoculação com <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Padrão de peso molecular indicado a esquerda no gel. Coloração realizada com nitrato de prata.....	47
Figura 21. SDS-PAGE 10%. A: perfil eletroforético das proteínas do corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> inoculadas com suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . B: repetição do grupo Ma INO 24 (SDS-PAGE 10%) para confirmação das proteínas presentes na amostra. Dissecção dos corpos gordurosos realizada com 24 e 48 horas após o tratamento. Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com Coomassie Coloidal.....	48
Figura 22. Foto escaneada de SDS-PAGE 12% de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> inoculadas com suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> coletados 24 e 48 horas após o tratamento. As bandas destacadas foram excisadas, hidrolisadas e analisadas por ESI-Q-Tof. Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com Coomassie Coloidal.....	49
Figura 23. Análise comparativa do gel 2D de proteínas do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> inoculadas com fungos usando tiras IPG (pH 3-10) e SDS-PAGE 15%. A: controle inoculado com água destilada estéril e Tween 80 0,1%;; B: inoculação com <i>Fusarium oxysporum</i> ; C: inoculação com <i>Beauveria bassiana</i> . Hemolinfa coletada 24 horas após o tratamento. Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com Coomassie Coloidal. Todos os spots foram excisados do gel, hidrolisados e analisados por Maldi-Tof-Tof.....	51

Figura 24. Cromatograma do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* obtido após passagem na coluna Superose. Hemolinfa coletada 48 horas após o tratamento por imersão com os fungos *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. A: Grupo controle; B: Ma IME 48; C: Bb IME 48; D: Fo IME 48..... 52

Figura 25. Cromatograma das amostras de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* filtradas em membrana de 100 kDa analisadas na coluna C18. As fêmeas foram tratadas por imersão em suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* e a coleta da hemolinfa realizada 24 horas (A) e 48 horas (B) após a infecção. 1: tampão utilizado na coleta da hemolinfa (coquetel de inibidor de proteases e tampão 1,5 M NaCl, 50mM EDTA); 2: grupo controle; 3: *M. anisopliae* s.l.; 4: *B. bassiana* e 5: *F. oxysporum*..... 53

Figura 26. Cromatograma das amostras de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* filtradas em membrana de 100 kDa e analisadas na coluna C18. As fêmeas foram tratadas por inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* e a coleta da hemolinfa realizada 24 horas (A) e 48 horas (B) após a infecção. 1: grupo controle (PICADO); 2: grupo controle (H2O INO); 3: *M. anisopliae* s.l.; 4: *B. bassiana* e 5: *F. oxysporum*..... 54

Figura 27. Cromatograma das amostras de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* filtradas em membrana de 10 kDa analisadas na coluna C18. As fêmeas foram tratadas por imersão em suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* e a coleta da hemolinfa realizada 24 horas (A) e 48 horas (B) após a infecção. 1: grupo controle (que não recebeu qualquer tratamento); 2: *M. anisopliae* s.l.; 3: *B. bassiana* e 4: *F. oxysporum*..... 55

Figura 28. Cromatograma das amostras de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* filtradas em membrana de 10 kDa e analisadas na coluna C18. As fêmeas foram tratadas por inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* e a coleta da hemolinfa realizada 24 horas (A) e 48 horas (B) após a infecção. 1: grupo controle (PICADO); 2: grupo controle (H2O INO); 3: *M. anisopliae* s.l.; 4: *B. bassiana* e 5: *F. oxysporum*..... 56

Figura 29. Teste de difusão em meio sólido (antifungigrama) do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão com *Beauveria bassiana* (Bb IME 48). A-D: *B. bassiana* com 48 horas de crescimento em meio de cultivo BDA acrescido de cloranfenicol 0,5%. A: controle do teste de difusão em meio sólido contendo o disco de papel filtro sem qualquer amostra; B: reverso da placa controle do disco de papel filtro; C: inibição do crescimento de *B. bassiana* em três discos de papel; D: reverso da placa mostrando inibição do crescimento de *B. bassiana* em três discos por Bb IME 48. E e F: *B. bassiana* com 72 horas de crescimento em meio de cultivo BDA acrescido de cloranfenicol 0,5%. E: zonas de redução de crescimento ao redor dos discos de papel; F: inibição de crescimento de *B. bassiana*..... 58

- Figura 30.** Cromatograma do plasma da hemolinfa com atividade antimicrobiana contra *Beauveria bassiana* (grupo Bb IME 48) obtido após passagem na gelfiltração (coluna Superose) (A). Na figura A, o pico iniciado em 42 minutos (indicado pela seta preenchida) foi coletado e aplicado em uma coluna analítica C18 (B). A atividade das frações representadas pelas setas 1, 2, 3, 4 e 5 foi testada contra *B. bassiana*..... 59
- Figura 31.** Atividade anti-*Beauveria bassiana* das frações coletadas após passagem do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (grupo Bb IME 48) em coluna analítica C18. Avaliação realizada com 24 horas. A: controle do teste de difusão em meio sólido contendo o disco de papel sem qualquer amostra; B: fração coletada em 25 minutos; C: fração coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo I); D e E: fração coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo II); F: fração coletada em 39 minutos (microtubo II); G e H: fração coletada em 43 minutos e 27 segundos; I e J: fração coletada em 45 minutos e 23 segundos..... 61
- Figura 32.** Atividade anti-*Beauveria bassiana* das frações coletadas após passagem do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (grupo Bb IME 48) em coluna analítica C18. Avaliação realizada com 48 horas. A: fração coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo I); B e C: fração coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo II); D: fração coletada em 39 minutos (microtubo II); E e F: fração coletada em 43 minutos e 27 segundos; G e H: fração coletada em 45 minutos e 23 segundos..... 62
- Figura 33.** Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 45 minutos e 23 segundos, que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido; C: imagem ampliada do íon m/z 1.119,5..... 64
- Figura 34.** Cromatograma do plasma da hemolinfa do grupo Bb IME 48 que ficou armazenada a -20 °C durante 2 anos obtido após passagem na coluna Superose (A). O pico iniciado em 40 minutos e finalizado em 47 minutos foi coletado e aplicado em uma coluna analítica C18 (B). As frações representadas pelas setas apresentaram atividade antimicrobiana contra *Beauveria bassiana*..... 65
- Figura 35.** Atividade anti-*Beauveria bassiana* do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (grupo Bb IME 48). Amostra passada na coluna Superose e posteriormente em coluna analítica C18. Avaliação realizada com 24 horas. A: fração eluída na C18, coletada em 40 minutos; B: fração coletada em 46 minutos e 23 segundos..... 66
- Figura 36.** Composição de fosfolipídeos no plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão ou inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à análise densitométrica.FS: frente do solvente; PC: fosfatidilcolina; PI: fosfatidilinositol; O: origem. Cada grupo continha 90 fêmeas..... 67

Figura 37. Percentual de fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI) no plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão ou inoculação com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Cada grupo continha 90 fêmeas..... 68

Figura 38. Composição de lipídeos neutros no plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão ou inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à densitometria. FS: frente do solvente; CHOE: colesterol-éster; AG: ácidos graxos livres; CHO: colesterol livre; MG: monoacilglicerol; O: origem. Cada grupo continha 90 fêmeas..... 69

Figura 39. Percentual de ácidos graxos livres (AG), colesterol livre (CHO) e colesterol éster (CHOE) no plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão ou inoculação com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Cada grupo continha 90 fêmeas..... 71

Figura 40. Composição de fosfolipídeos nos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão ou inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência foi escaneada e submetida à densitometria. Lane 1: CTR 24; Lane 2: Ma IME 24; Lane 3: Bb IME 24; Lane 4: Fo IME 24; Lane 5: PICADO 24; Lane 6: H2O 24; Lane 7: Ma INO 24; Lane 8: Bb INO 24; Lane 9: Fo INO 24; Lane 10: CTR 48; Lane 11: Ma IME 48; Lane 12: Bb IME 48; Lane 13: Fo IME 48; Lane 14: PICADO 48; Lane 15: H2O 48; Lane 16: Bb INO 48; Lane 17: Fo INO 48; Lane 18: PC (20 µg); Lane 19: PE (20 µg). FS: frente do solvente; PE: fosfatidiletanolamina; PC: fosfatidilcolina; O: origem. Cada grupo continha 90 fêmeas..... 72

Figura 41. Composição de lipídeos neutros nos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão ou inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência foi escaneada e submetida à densitometria. Lane 1: CTR 24; Lane 2: CTR 48; Lane 3: Ma IME 24; Lane 4: Ma IME 48; Lane 5: Bb IME 24; Lane 6: Bb IME 48; Lane 7: Fo IME 24; Lane 8: Fo IME 48; Lane 9: H2O 24; Lane 10: H2O 48; Lane 11: Ma INO 24; Lane 12: Ma INO 48; Lane 13: Bb INO 24; Lane 14: Bb INO 48; Lane 15: Fo INO 24; Lane 16: CHOE e DG (20 µg); Lane 17: TG (20 µg), Lane 18: CHO (20 µg); Lane 19: AG (20 µg). FS: frente do solvente; CHOE: colesterol-éster; AG: ácidos graxos livres; CHO: colesterol livre; MG: monoacilglicerol; O: origem. Cada grupo continha 90 fêmeas..... 73

Figura 42. Percentual de fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilcolina (PC) nos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão ou inoculação com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Valores

obtidos a partir da análise densitométrica. Cada grupo continha 90 fêmeas..... 74

Figura 43. Percentual de ácidos graxos livres (AG), colesterol livre (CHO) e colesterol éster (CHOE) nos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão ou inoculação com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Cada grupo continha 90 fêmeas..... 75

Figura 44. Composição de lipídeos neutros no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à densitometria. Lane 1: CTR 24; Lane 2: CTR 48; Lane 3: H2O 24; Lane 4: H2O 48; Lane 5: Ma INO 24; Lane 6: Ma INO 48; Lane 7: Bb INO 24; Lane 8: Bb INO 48; 9: Fo INO 24; Lane 10-13: padrões de triacilglicerol (TG) nas concentrações 5, 10, 15 e 20 µg respectivamente; Lane 14-16: padrões de colesterol esterificado (CHOE) e ácidos graxos livres (AG) nas concentrações 10, 15 e 20 µg, respectivamente; Lane 17-19: padrões de colesterol livre (CHO) nas concentrações 30, 20 e 40 µg, respectivamente. FS: frente do solvente; O: origem. Cada grupo continha 10 fêmeas..... 76

Figura 45. Percentual relativo das alterações quantitativas de triacilglicerol (TG), ácidos graxos livres (AG), colesterol livre (CHO) e colesterol-éster (CHOE) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* sobre placa de sílica de cromatografia em camada delgada. O grupo controle de cada tempo de observação foi considerado 100%. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Cada grupo continha 10 fêmeas..... 77

Figura 46. Composição de triacilglicerol (TG) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com *Metarhizium anisopliae* s.l. ou *Beauveria bassiana* sobre placa de sílica de cromatografia em camada delgada para lipídeos neutros. Lane 1: padrão de TG (20 µg); Lane 2: CTR 24; Lane 3: H2O 24; Lane 4: Ma INO 24; Lane 5: Bb INO 24; Lane 6: CTR 48; Lane 7: Ma INO 48; Lane 8: Bb INO 48. Cada grupo continha 10 fêmeas..... 78

Figura 47. Percentual relativo da atividade lipase no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Cada grupo continha 10 corpos gordurosos. O ensaio foi realizado duas vezes. O percentual da atividade lipase foi obtido por comparação, sendo o grupo controle (CTR) 24 horas considerado como 100%..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados dos fungos utilizados nos bioensaios com fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> , suas respectivas espécies, hospedeiros, origens e ano de recebimento da cultura na ESALQ e na UFV.....	19
Tabela 2. Identificação dos grupos de fêmeas ingurgitadas estabelecidos nos tratamentos por imersão ou inoculação.....	21
Tabela 3. Protocolo de isoeletrofocalização no Protean® IEF Cell (Bio-rad®) para fitas IPG 7 cm.....	25
Tabela 4. Solução tampão de equilíbrio I com SDS (Bio-rad) para incubação das tiras IPG utilizadas na isoeletrofocalização de proteínas (primeira dimensão do 2D-PAGE).	25
Tabela 5. Solução tampão de equilíbrio II com SDS (Bio-rad) para incubação das tiras IPG utilizadas na isoeletrofocalização de proteínas (primeira dimensão do 2D-PAGE).....	26
Tabela 6. Lista das proteínas identificadas em hemócitos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas por imersão ou inoculação de suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> . Hemolinfa coletada 24 e 48 horas após o tratamento. Identificação realizada por MS/MS.....	50
Tabela 7. Atividade antimicrobiana das frações do plasma da hemolinfa de Bb IME 48 obtidas de FR-CLAE em coluna analítica C18. Número de halos de inibição de crescimento de <i>Beauveria bassiana</i> formados em cada fração coletada e seus respectivos diâmetros (cm).....	60
Tabela 8. Atividade antimicrobiana do pico do plasma da hemolinfa de Bb IME 48 obtido após passagem em coluna Superose, armazenado a -20 °C durante 2 anos e reaplicadas em FR-CLAE em coluna analítica C18. Quantidade e diâmetro do (s) halo (s) de inibição de crescimento formado (s) em cada fração.....	66
Tabela 9. Distribuição das classes de lipídeos encontradas no corpo gorduroso de fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i> inoculadas com <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> ou <i>Fusarium oxysporum</i> (Média ± Desvio Padrão).....	79

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem
× *g* – força da gravidade
°C – graus Celsius
≈ - aproximadamente
μg - micrograma
μL -microlitro
1D-PAGE one dimensional - polyacrylamide gels electrophoresis
2D-PAGE – two dimensional – polyacrylamide gels electrophoresis
ACN – acetonitrila
BDA – batata-dextrose-ágar
BPTI - Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor
CHAPS - 3-[(3cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CuSO₄ - sulfato de cobre
Da – Daltons
DIGE- Difference gel electrophoresis
DMPTB - 2,3-dimercapto-1-propanol tributyrate
DTNB - 5,5'-dithiobis(2-nitro benzoic acid)
DTT- dithiothreitol
EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid
ESI- electrospray ionization
FR-CLAE - Fase Reversa da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
GNBP 3- Gram-negative binding protein 3
H₃PO₄- ácido fosfórico
HCl – ácido clorídrico
h-hora
IEF - focalização isoeétrica
Imd- immune deficiency
IPG – Immobilized pH gradient
kDa – kilodaltons
kV - kilovolts
M – molar
m/z - relação massa/carga
mA – miliamper
MALDI- matrix assisted laser desorption ionization
min-minuto
mL- mililitro
mm - milímetro
mM - milimolar
MS- mass spectrometry
MS/MS – tandem mass spectrometry
N – normal
Na₂CO₃ – carbonato de sódio
Na₂S₂O₃.5H₂O - tiosulfato de sódio
NaOH – hidróxido de sódio
NH₄HCO₃ – bicarbonato de amônio

nm - nanômetro
nseg-nanosegundo
p/v – peso/volume
PGRP-SA - peptidoglycan recognition protein-SA
pH – potencial hidrogeniônico
pNPP- p-nitrophenyl phosphate
Psi – unidade de pressão
rpm – rotação por minuto
SDS - sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels electrophoresis
s-segundo
TCA – ácido tricloroacético
TEMED - N, N, N'- tetramethylethylenediamine
TFA – ácido trifluoroacético
TOF – time of flight
Tris - Trishydroxymethylaminomethane
UFC – unidade formadora de colônia
UR – umidade relativa
V - volts
v/v – volume/volume
W - watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	O Carrapato dos Bovinos.....	3
2.2	Fungos Entomopatogênicos.....	4
2.3	Sistema Imune de Invertebrados.....	6
2.4	Hemolinfa.....	9
2.5	Proteínas Presentes na Hemolinfa.....	10
2.6	Peptídeos Antimicrobianos.....	12
2.7	Lipídeos.....	14
2.8	Corpo Gorduroso.....	15
2.9	Lipases.....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Localização dos Experimentos.....	18
3.2	Obtenção de Carrapatos.....	18
3.3	Obtenção e Manutenção dos Fungos.....	18
3.4	Preparo das Suspensões Fúngicas.....	19
3.5	Viabilidade dos Conídios.....	19
3.6	Delineamento Experimental.....	19
3.6.1	Tratamento por Imersão.....	19
3.6.2	Tratamento por Inoculação.....	20
3.7	Coleta da Hemolinfa.....	20
3.8	Dissecção dos Corpos Gordurosos.....	22
3.9	Reisolamento dos Fungos após Bioensaios.....	22
3.10	Dosagem de Proteínas.....	22
3.11	Quantificação de Hemócitos.....	22
3.12	Análise Estatística.....	22
3.13	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE).....	23
3.13.1	Sob condições desnaturantes.....	23
3.13.2	Sob condições nativas.....	23
3.13.3	Corrida eletroforética.....	23
3.13.4	Coloração dos géis.....	23
3.14	Análise Proteômica (gel 1D).....	23
3.14.1	Digestão com Tripsina (1D).....	23
3.14.2	Espectrometria de Massas – ESI-Q-TOF.....	24
3.15	Eletroforese Bidimensional.....	24
3.15.1	Primeira dimensão- Isoeletrofocalização (IEF).....	24
3.15.2	Segunda dimensão - SDS-PAGE.....	25
3.16	Análise Proteômica (gel 2D).....	26
3.16.1.	Digestão com tripsina.....	26
3.17	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	26
3.18	Atividade Antimicrobiana do Plasma da Hemolinfa.....	27
3.18.1	Teste de difusão em meio sólido – antibiograma.....	27
3.18.2	Teste de difusão em meio sólido – antifungigrama.....	27
3.19	. Análise Proteômica das Frações com Atividade Antimicrobiana.....	28

3.19.1	Espectrometria de massas – MALDI-TOF.....	28
3.20	Busca no Banco de Dados.....	28
3.21	Extração de Lipídeos.....	28
3.22	Análises dos Lipídeos.....	29
3.23	Determinação da Atividade Lipase no Corpo Gorduroso.....	29
3.23.1.	Preparo da enzima (lipase).....	29
3.23.2	Determinação da atividade lipase.....	29
4	RESULTADOS	31
4.1	Viabilidade dos Conídios.....	31
4.2	Reisolamento dos Fungos após Bioensaios.....	31
4.3	Coleta da Hemolinfa.....	34
4.4	Dosagem de Proteínas.....	35
4.5	Quantificação de hemócitos.....	39
4.6	Eletroforese Unidimensional (SDS-PAGE).....	41
4.7	Análise proteômica – gel 1D	48
4.8	Eletroforese Bidimensional.....	50
4.9	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	51
4.9.1	Superose.....	51
4.9.2	C18.....	52
4.10	Atividade Antimicrobiana do Plasma da Hemolinfa.....	57
4.10.1	Teste de difusão em meio sólido – antibiograma.....	57
4.10.2	Teste de difusão em meio sólido – antifungigrama.....	57
4.10.3	Antifungigrama das frações do plasma da hemolinfa do grupo Bb IME 48..	59
4.11	Análises dos Lipídeos.....	67
4.11.1	Plasma da hemolinfa.....	67
4.11.2	Hemócitos.....	72
4.11.3	Corpo gorduroso.....	76
4.12	Atividade Lipase no Corpo Gorduroso.....	79
5	DISCUSSÃO	81
5.1	Infecção de <i>Rhipicephalus microplus</i> com Fungos.....	81
5.2	Perfil Protéico de <i>R. microplus</i> após desafio microbiano.....	83
5.2.1	Concentração de proteína total.....	83
5.2.2	Quantidade de hemócitos.....	84
5.2.3	Eletroforese e análises proteômicas.....	85
5.2.4	Cromatografia (CLAE) e atividade antimicrobiana do plasma da hemolinfa.....	87
5.3	Perfil Lipídico.....	88
5.3.1	Hemolinfa (plasma/hemócitos).....	88
5.3.2	Corpo gorduroso.....	89
6	CONCLUSÕES	91
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
	ANEXOS	109
A	- Protocolo para dosagem de proteína total pelo método de Lowry modificado (MARKWELL et al., 1978).....	110
B	- Soluções para o preparo do gel de empacotamento 5%.....	111

C - Soluções para o preparo do gel de corrida.....	112
D - Protocolo para coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata.....	113
E - Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 25 minutos (microtubo I), que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.....	114
F - Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo I), que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.....	115
G - Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo II), que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: imagem ampliada dos espectros iniciais obtidos no modo linear; C: espectro obtido no modo refletido.....	116
H - Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 39 minutos (microtubo II), que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.....	117
I - Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 43 minutos e 27 segundos, que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: imagem ampliada dos espectros iniciais do modo linear; C: espectro obtido no modo refletido.....	118
J - Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 40 minutos que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.....	119
L- Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 46 minutos e 23 segundos que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.....	120

1 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus é conhecido como carrapato dos bovinos e encontra-se amplamente distribuído nas regiões de climas tropical e subtropical. Apresenta extrema relevância para a pecuária nacional, uma vez que os prejuízos econômicos giram em torno de US\$ 2 bilhões por ano. Esses gastos são inerentes ao controle deste parasito (utilização de carrapaticidas e mão-de-obra para aplicação) bem como aos prejuízos decorrentes do seu parasitismo, como depreciação do couro, diminuição da produção, transmissão de agentes patogênicos entre outros. Além disto, ainda há problemas com a contaminação do ambiente e dos produtos de origem animal, como a carne e o leite.

O controle deste parasito é feito basicamente com produtos químicos e a utilização maciça e inadequada destes acaricidas tem conduzido ao desenvolvimento de cepas de carrapatos resistentes. A utilização de fungos entomopatogênicos vem se tornando uma alternativa ao controle clássico de carrapatos e apresentam como grande vantagem seu mecanismo de penetração através da cutícula dos hospedeiros, especificidade parasitária e sua relativa segurança ambiental. Muitos entomopatógenos são utilizados com sucesso no controle de pragas agrícolas, sendo *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* os mais empregados.

O entendimento da fisiologia e do sistema imune de carrapatos é de fundamental importância para a realização do controle eficaz deste parasito. No entanto, o conhecimento atual da imunidade de carrapatos ainda é pequeno quando comparado com as informações já obtidas com insetos. De um modo geral, a resposta imune dos invertebrados pode ser dividida em resposta celular, que compreende mecanismos como fagocitose, nodulação e encapsulamento e que são mediados pelos hemócitos; e resposta humoral, em que há síntese e produção de peptídeos antimicrobianos, espécies reativas de oxigênio, a coagulação e a melanização. As informações disponíveis sobre a composição da hemolinfa de *R. microplus* são limitadas e infecções provocadas por microorganismos invasores refletem alterações nesta composição.

Os lipídeos têm muitas funções no sistema biológico, energético e estrutural dos seres vivos em geral, e a principal delas está na formação da bicamada lipídica celular. Sua função e o modo de utilização pelos tecidos são melhor estudados em insetos do que em carrapatos e processos infecciosos também refletem alterações em sua quantidade e distribuição nos tecidos. O corpo gorduroso, órgão de extrema importância no metabolismo de artrópodes, está envolvido com o armazenamento de lipídeos e com a atividade biosintética, sofrendo alterações morfológicas e fisiológicas durante o processo infeccioso.

Em carrapatos, a síntese dos peptídeos antimicrobianos é realizada principalmente no corpo gorduroso e pelos hemócitos, sendo então liberados na hemolinfa para combater infecções sistêmicas. Intensos estudos têm sido realizados com o intuito de identificar peptídeos, pois estes apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias e fungos, com grande potencial de utilização como antibióticos no combate aos microorganismos resistentes aos antibióticos convencionais.

Atualmente, o estudo do conjunto de proteínas expressas no genoma ou tecido dos artrópodes tem sido amplamente explorado e representa as condições nas quais o indivíduo se encontra. No entanto, alterações destas proteínas ocorrem em resposta aos fatores de estresse induzidos por uma infecção, por exemplo. Desta maneira, através de estudos do proteoma, poderemos entender o funcionamento dessas proteínas e fazer uma comparação entre as proteínas encontradas no carrapato sadio e as encontradas no carrapato infectado, o que poderá ajudar na descoberta de novos alvos a serem utilizados no controle deste parasito.

O presente trabalho integra a linha de pesquisa Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médica e Veterinária desenvolvida na UFRRJ e teve como objetivo geral avaliar as possíveis alterações nos perfis protéico e lipídico da hemolinfa e do corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* infectadas com *M. anisopliae*, *B. bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Os objetivos específicos do presente estudo foram: avaliar o perfil protéico da hemolinfa através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e cromatografia líquida de alta eficiência; avaliar a atividade antimicrobiana da hemolinfa pura e de suas frações obtidas através da CLAE; analisar as frações da hemolinfa com atividade antimicrobiana por espectrometria de massas; identificar proteínas diferencialmente expressas na hemolinfa após a infecção através da espectrometria de massas; avaliar o perfil protéico do corpo gorduroso através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida; avaliar as possíveis alterações no perfil lipídico da hemolinfa e do corpo gorduroso utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), além de mensurar a atividade lipase no corpo gorduroso.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Carrapato dos Bovinos

Rhipicephalus microplus é um carrapato pertencente ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Ixodida, subordem Acari, superfamília Ixodoidea e à família Ixodidae. É originário do continente asiático e foi introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais pela importação do gado bovino (WHARTON, 1974). Encontra-se distribuído nos rebanhos bovinos das Américas Central e do Sul, Leste e Sul da África, Austrália, Oriente e sul da Flórida, na faixa compreendida entre os paralelos 32° Norte (sul dos EUA) e 32° Sul (próximo à cidade de Rio Grande, RS) (GONZÁLES, 2002).

É parasita de um único hospedeiro (homoxeno) e apresenta o ciclo evolutivo dividido em duas fases: fase de vida livre e fase de vida parasitária (Figura 1). A fase de vida livre ocorre no solo e se inicia quando a fêmea ingurgitada se desprende do hospedeiro, cai ao solo, começando então, o período de pré-postura, que dura em média de dois a três dias. Posteriormente, há a fase de ovopostura, que pode variar de 17 a mais de 90 dias, seguida pela fase de eclosão das larvas, que varia de cinco a dez dias. Um período de quatro a 20 dias é necessário para que as larvas tornem-se infestantes. Em condições ótimas de temperatura e umidade, o ciclo de vida livre pode durar 28 dias (GONZÁLES, 1974). Segundo Gonzáles (1975), a fase de vida livre sofre variações em decorrência das alterações da temperatura e umidade, porém a fase de vida parasitária é praticamente constante em todas as regiões.

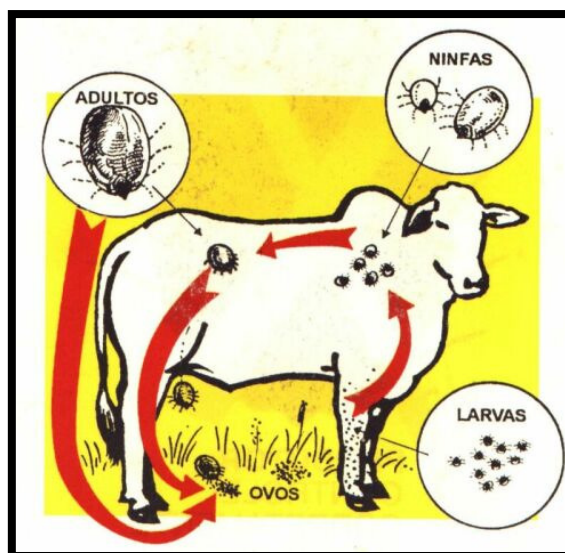


Figura 1. Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*. Fase de vida parasitária: inicia-se com a fixação das larvas infestantes no hospedeiro; após as ecdises, as larvas mudam para ninfas, e as ninfas mudam para adultos sobre o hospedeiro. Após o completo ingurgitamento, as fêmeas caem ao solo, iniciam a postura e há eclosão das larvas no ambiente (fase de vida livre).

A fase de vida parasitária inicia-se com a fixação da larva infestante no hospedeiro, seguida pela sua alimentação, troca de cutícula, fase adulta, acasalamento, ingurgitamento e queda das fêmeas. Esse período dura, em média, de 18 a 26 dias no Brasil-Central (FURLONG, 1993).

O impacto econômico das principais ectoparasitoses no Brasil foi estimado por Grisi et al. (2002) em 2.650 bilhões de dólares/ano, sendo o carrapato *R. microplus* responsável por 2 bilhões de dólares. Os prejuízos econômicos são decorrentes da ação espoliativa sobre o hospedeiro, da predisposição ao aparecimento de míases, da desvalorização do couro, do retardo no desenvolvimento dos animais, diminuição da produção, excessivos gastos com mão-de-obra e carrapaticidas e pela transmissão de patógenos causadores de doenças como anaplasmose e babesiose (HORN; ARTECHE, 1985; GUIMARÃES et al., 1998; HEUCHERT et al., 1999).

O controle da fase parasitária de *R. microplus* é feito basicamente por aplicação de carrapaticidas no rebanho. Contudo, os freqüentes tratamentos com produtos químicos e o manejo inadequado tem conduzido o desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes. Segundo Wharton (1967), as cepas resistentes aos acaricidas se desenvolvem por seleção e recombinações de genes resistentes em populações de carrapatos expostas a pressão de seleção por carrapaticidas.

Uma redução da população de carrapatos no rebanho pode ser alcançada melhorando a eficácia no seu controle através da seleção e aplicação correta do carrapaticida e utilizando o sistema estratégico de controle associado a outras práticas de manejo (FURLONG et al., 2004). De acordo com Penna (1990), outros métodos para controlar a população de carrapatos seriam a rotação de pastagens, o controle biológico, a criação de raças de animais resistentes aos carrapatos, introdução de machos estéreis na população e atividades como a queimada. Todavia, nem todos esses métodos são eficientes ou mesmo indicados.

A utilização exclusiva dos carrapaticidas é cada dia menos viável em termos práticos e econômicos, tornando-se necessária a adição de métodos alternativos a serem empregados em sistemas de controle integrado (BARROS; EVANS, 1989).

2.2 Fungos Entomopatogênicos

O número de trabalhos publicados por pesquisadores na área de controle microbiano de carrapatos envolvendo fungos, vírus, bactérias, protozoários e nematóides está se tornando crescente (SAMISH; REHACEK, 1999). Esses autores revisaram mais de 100 espécies de patógenos e aproximadamente 150 predadores associados com carrapatos, o que representa um amplo arsenal para seleção de espécies com potencial uso como agentes de biocontrole.

Cerca de 750 espécies de fungos agrupados em 56 gêneros são conhecidos por serem patógenos ou parasitos de artrópodes (HAWKSWORTH et al., 1995) e aproximadamente 170 produtos, oriundos de cerca de 13 espécies de fungos, têm sido formulados e registrados como micoinseticidas ou micoacaricidas em programas de controle biológico contra várias espécies de pragas (DE FARIA; WRAIGHT, 2007). A maioria dos fungos patogênicos de artrópodes estudados mundialmente pertence a quatro gêneros: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* (= *Verticillium*) e *Isaria* (= *Paecilomyces*). As espécies *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *L. lecanii* (= *V. lecanii*), *Isaria farinosa* (= *P. farinosus*) e *I. fumosorosea* (= *P. fumosoroseus*) são patogênicas tanto para insetos quanto para ácaros e carrapatos (CHANDLER et al., 2000; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

Os fungos entomopatogênicos foram os primeiros patógenos a ser utilizados no controle microbiano e atualmente são os agentes de biocontrole mais estudados e empregados mundialmente no controle de pragas devido a sua maior eficiência em causar a morte de seu hospedeiro, a grande variabilidade genética que permite selecionar isolados altamente

virulentos, específicos ou não, para o controle de um grande número de pragas, e sua relativa segurança ambiental (ALVES, 1998; THOMAS; READ, 2007). A compatibilidade dos fungos com produtos químicos visando a ação sinérgica e conseqüentemente um controle mais rápido e eficaz tem sido investigada para o controle de *R. microplus* (BAHIENSE et al., 2008).

O gênero *Metarhizium* Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) é composto por fungos entomopatogênicos anamórficos que parasitam uma ampla variedade de espécies de artrópodes. As espécies de *Metarhizium* são frequentemente isoladas do solo de regiões tropicais e temperadas por todo o mundo. Muitos isolados deste fungo vêm sendo estudados como agente de controle biológico de uma ampla variedade de espécies de artrópodes em diversos países, incluindo o Brasil (FERRON et al., 1991; ALVES, 1998). As duas espécies mais conhecidas do gênero *Metarhizium* são: *M. anisopliae* (METSCHNIKKOFF, 1879; SOROKIN, 1883) e *M. flavoviridae* (GAMS; ROZYPAL, 1973). *Metarhizium album* (ROMBACH et al., 1987) e *M. frigidum* (BISCHOFF et al., 2006) também são espécies reconhecidas.

Diversos estudos demonstraram uma grande variabilidade genotípica entre isolados de *M. anisopliae*, e sugeriram que esta espécie era possivelmente um agregado de espécies (ST. LEGER et al., 1992; BIDOCHKA et al., 2005; FERNANDES et al., 2010). Recentemente, um amplo estudo filogenético determinou que *M. anisopliae* é um complexo constituído de quatro espécies: *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii*, e *M. brunneum* (BISCHOFF et al., 2009). Os isolados de *M. anisopliae* s.l., cujas espécies ainda não foram confirmadas/identificadas de acordo com Bischoff et al. (2009), devem ser considerados pertencentes ao complexo *M. anisopliae* s.l. e por isso devem ser considerados como senso latu (s.l.).

Além da variação genotípica observada entre os isolados do complexo *M. anisopliae*, variações morfológicas e fisiológicas também já foram relatadas (LOMER et al., 2001; FERNANDES et al., 2010). Em função destas variações, diferentes níveis de virulência têm sido detectados entre isolados de *M. anisopliae* para muitas espécies de artrópodes, inclusive carrapatos (ALVES, 1998; FERNANDES et al., 2004; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

A virulência do fungo entomopatogênico está relacionada com seu processo de infecção, que tem sido o tema de intensas pesquisas desenvolvidas com o objetivo de caracterizar os fatores de virulência que facilitam o processo de infecção e a especificidade por hospedeiro, uma das mais importantes vantagens do controle biológico (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). O mecanismo de penetração desses fungos entomopatogênicos ocorre via tegumento através de processos químicos (como digestão enzimática) e processos físicos, por pressão mecânica (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Essa via de penetração foi comprovada por Bittencourt et al. (1995), uma vez que a infecção do fungo *M. anisopliae* não foi evidenciada, por técnicas histológicas, nas cavidades naturais do carrapato *R. microplus*.

Bittencourt et al. (1999) descreveram pela primeira vez o mecanismo de infecção do isolado 959 de *M. anisopliae* em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, no qual foi observada a fixação de conídios na cutícula do carrapato, germinação de conídio, formação de tubo germinativo e início da dilatação da extremidade deste tubo, formando o apressório (estrutura especializada de penetração). Após a formação do apressório, há o desenvolvimento de uma estrutura denominada grampo de penetração, que inicia o processo de penetração na cutícula. Essa fase de penetração envolve um processo físico, no qual há pressão mecânica da hifa terminal através do apressório e grampo de penetração, e um processo químico, referente à produção de enzimas hidrolíticas tais como quitinases, proteases e lipases (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). A composição complexa da cutícula do hospedeiro requer a ação

sinérgica de diferentes enzimas para degradar seus principais constituintes (proteínas, quitina e lipídeos) e permitir a penetração da hifa (LUBECK et al., 2008).

Após a penetração do fungo, inicia-se o processo de colonização em que as hifas sofrem engrossamento, ramificam-se e diferenciam-se em blastosporos na hemocele do hospedeiro. Além de se multiplicarem na hemocele e tecidos moles, os fungos produzem metabólitos secundários como ácidos graxos e toxinas ciclodepsipeptídicas, conhecidas como destruxinas, que intensificam o processo patogênico (WANG et al., 2004). Existem cinco tipos de destruxina (A, B, C, D e E) além de outras 38 variantes (HU et al., 2006). As destruxinas de fungos entomopatogênicos têm sido exaustivamente pesquisadas e caracterizadas como importantes fatores de virulência que aceleram a morte dos artrópodes infectados (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010), causando danos ao sistema muscular e aos túbulos de Malpighi, afetando a excreção e causando paralisia tetânica em seus hospedeiros (PAL et al., 2007). As destruxinas induzem o influxo de cálcio e fosforilação intracelular de proteínas dentro das células de lepidópteros após sua ligação na membrana das proteínas receptoras (DUMAS et al., 1996). Os isolados de *Metarhizium* que produzem maior quantidade de destruxina tendem a ser os mais virulentos (SREE et al., 2008).

A morte do hospedeiro infectado com fungos entomopatogênicos ocorre em um período de três a 10 dias em função da perda de água, privação de nutrientes, danos mecânicos e ação de toxinas. Sob condições favoráveis, o fungo esporula extensivamente sobre o cadáver do hospedeiro para facilitar novas infecções na população de hospedeiros e assim continuar seu ciclo (CHANDLER et al., 2000).

Uma das desvantagens da utilização destes agentes de controle microbiano é a sua susceptibilidade aos fatores ambientais como calor e radiação ultravioleta (RANGEL et al., 2004). No entanto, a seleção de isolados mais tolerantes e o desenvolvimento de formulações fúngicas podem aumentar a viabilidade dos conídios, permitindo sua utilização a campo (FARGUES et al., 1996). A utilização *in vitro* de formulação de fungos entomopatogênicos mostrou ser um importante fator no aumento da eficiência dos isolados fúngicos no controle de carrapatos (LOPES, et al., 2007; ANGELO et al., 2010).

A necessidade de métodos não-químicos para controlar pestes como ácaros e carrapatos tende a aumentar no futuro, devido à preocupação acerca da segurança e sustentabilidade dos pesticidas químicos (CHANDLER et al., 2000). Maiores informações sobre as doenças que afetam os carrapatos, sua susceptibilidade aos entomopatógenos e o funcionamento do seu sistema imune são necessárias para a aplicação eficaz do controle biológico (MONTEIRO et al., 2003).

2.3 Sistema Imune de Invertebrados

O mecanismo de defesa dos invertebrados compreende uma ampla variedade de barreiras físicas, químicas, fisiológicas e comportamentais que dificultam o acesso do patógeno ao interior do artrópode. Quando o patógeno consegue transpor as barreiras iniciais e atingir o corpo dos invertebrados, o sistema imune inato inicia uma série de reações, que podem ser classificadas em resposta celular e humoral (HOFFMANN; REICHHART, 2002; LAVINE; STRAND, 2003; LUO et al., 2003; MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009). Muito do nosso conhecimento atual sobre o sistema imunológico de insetos foi moldado por fortes estudos genéticos em *Drosophila melanogaster* (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007) e pelos dados obtidos de poucas espécies de lepidópteros, tais como *Manduca sexta* (KANOST et al., 2004).

Segundo Hoffmann (2003) o sistema imune inato é incapaz de estabelecer memória imunológica e os artrópodes, de um modo geral, contam com esta resposta imunológica para montar as reações de defesa contra organismos patogênicos, pois não há imunidade

adaptativa. No entanto, as respostas de memória têm sido descritas em invertebrados (MULLER et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010), um fenômeno que tem sido denominado *priming* imune (SCHMID-HEMPEL, 2005). Há vários exemplos de *priming* inespecíficos (ELEFThERIANOS, et al., 2006) e específicos (ROTH et al., 2010) em insetos que podem ser de longa duração. Embora estes estudos desafiem o dogma de que os invertebrados são incapazes de desenvolver resposta imune adaptativa, um mecanismo de memória imunológica inata não foi estabelecido (RODRIGUES et al., 2010).

As reações celulares ou imunidade celular são executadas pelos hemócitos e compreendem fagocitose, nodulação e encapsulamento enquanto as reações humorais compreendem processos de produção e liberação de peptídeos antimicrobianos, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além da ativação da cascata de enzimas que regulam a coagulação e a melanização da hemolinfa (IWANAGA; LEE, 2005; MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009).

A fagocitose é o processo de reconhecimento, englobamento e destruição intracelular dos patógenos invasores e envolve vários tipos de receptores de proteínas (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Também é importante durante o desenvolvimento dos artrópodes, participando da limpeza das células apoptóticas na hemolinfa (MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009). Na maioria dos insetos, os plasmatócitos e os granulócitos são as principais células fagocíticas, que ao receberem sinais da presença de bactérias ou outro microorganismo, migram rapidamente para o local da infecção e, eventualmente, fagocitam e destroem os invasores (SILVA et al., 2000; LAMPROU et al., 2007). A fagocitose tem sido observada em várias espécies de carrapatos e parece ser uma das defesas primárias contra a invasão de microorganismos (ZHIOUA et al., 1996); em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* os principais tipos celulares também foram os plasmatócitos (75,5%) e os granulócitos (24,5%), nos quais os plasmatócitos apresentaram o maior índice fagocítico *in vivo* contra leveduras (PEREIRA et al., 2001).

Quando a concentração de patógenos é muito grande, os hemócitos se agregam e formam nódulos a fim de imobilizá-los e removê-los da circulação. A nodulação é um mecanismo de defesa celular predominante em insetos e é mediada por eicosanóides em muitas espécies de insetos (STANLEY et al., 2009). Ainda não está muito bem caracterizado se a nodulação pode ser um processo mediado por lectinas (MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009).

Quando o agente estranho não pode ser fagocitado ou isolado em nódulos, os insetos se defendem formando cápsulas (STRAND; PECH, 1995). O encapsulamento refere-se à ligação dos hemócitos aos invasores maiores, protozoários e nematóides, formando uma cápsula com multicamadas ao redor do invasor, que em última instância, é acompanhado pela melanização. Dentro da cápsula, o patógeno é morto possivelmente pela produção local de produtos citotóxicos como espécies reativas de oxigênio (ROS) e intermediários da cascata de melanização (NAPPI; OTTAVIANI, 2000), porém a exata causa da morte ainda não é conhecida (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Em aracnídeos, o primeiro relato de ROS foi feito por Pereira et al. (2001). Essas ROS foram produzidas pelos hemócitos de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* após desafio com bactérias, zimosan e ésteres de forbol (PEREIRA et al., 2001).

De acordo com Michel e Kafatos (2005), a reação imunológica humoral pode ser dividida em quatro etapas: (1) o reconhecimento de moléculas microbianas, (2) modulação, levando à ampliação e disseminação do sinal de reconhecimento inicial, (3) ativação de um conjunto diversificado de moléculas efetoras entre elas, os peptídeos antimicrobianos e a cascata de melanização e (4) reposição de moléculas relacionadas ao sistema imunológico através da ativação das vias de transdução de sinal, relacionadas a via Toll, cujos receptores reconhecem estruturas moleculares conservadas na superfície dos patógenos (LEMAITRE,

2004) e a via Imd, predominantemente implicada na regulação de genes que codificam peptídeos antimicrobianos com atividade contra bactérias gram-negativas, incluindo cercropinas, drosocinas, dipterocinas e atacinas (BULET; STOCKLIN, 2005).

Em *D. melanogaster*, as reações humorais antimicrobianas geradas a partir de infecções causadas por bactérias ou fungos são específicas. A atividade antimicrobiana em *Drosophila*, regulada pelas duas vias distintas de sinalização intracelular, Toll e Imd, é ativada por diferentes patógenos, sendo a via Imd responsável pela resposta à infecção por bactérias gram-negativas. Em contraste, a via Toll é ativada por fungos e bactérias gram-positivas, que regulam a expressão de vários genes de peptídeos antimicrobianos (PAMs), como drosomicina (LEMAITRE et al., 1997; HOFFMANN, 2003; LEE et al., 2009). Um ponto-chave da via Toll é a cascata proteolítica extracelular (WEBER et al., 2003), que é regulada negativamente por uma serpina, impedindo que a via Toll funcione como um receptor de reconhecimento padrão na defesa de *Drosophila* (LEVASHINA et al., 1999).

A infecção de *Drosophila* por *B. bassiana* leva à expressão de outros genes Toll-dependentes através de uma ativação seletiva da via Toll (LEMAITRE et al., 1997; DE GREGORIO et al., 2001) mediada pela via GGBP 3, que detecta β -1,3-glicano, um componente da parede celular de fungos, e ativa os três passos da cascata de serino-proteínases para ativação desta via de sinalização (GOTTAR et al., 2006; LEE et al., 2009). Por outro lado, a ativação da via Toll por bactérias gram-positivas envolve duas proteínas extracelulares, uma proteína de reconhecimento do peptidoglicano, PGRP-SA (MICHEL et al., 2001) e uma GGBP 1 (GOBERT et al., 2003).

Estudos realizados com mutantes de *Drosophila* Toll-deficientes mostraram aumento da susceptibilidade ao fungo *B. bassiana* (TZOU et al., 2002), porém os mecanismos de mediação de resistência da via Toll contra este entomopatógeno ainda não estão estabelecidos (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Embora muito tenha sido aprendido sobre imunidade de *Drosophila* através de estudos genéticos, muitos aspectos permanecem subentendidos, em particular a identidade das moléculas que são recrutadas na hemolinfa durante a ativação das cascatas de sinalização (LEVY et al., 2004).

Poucas informações estão disponíveis sobre proteínas antimicrobianas na hemolinfa de carrapatos, com exceção de relatos sobre lisozimas, lectinas e evidências de peptídeos inespecíficos (JOHNS et al., 1998; SONENSHINE; HYNES, 2008). A defensina apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e pode agir sinergicamente com lisozimas contra bactérias gram-negativas e fungos (JOHNS et al., 2001b). Entre os peptídeos antimicrobianos identificados em *R. microplus*, foram descritos a defensina e ixodidina, encontradas nos hemócitos (FOGAÇA et al., 2004; FOGAÇA et al., 2006, respectivamente) e a microplusina, identificada no plasma da hemolinfa (FOGAÇA et al., 2004) e nos ovos (ESTEVEVES et al., 2009). O plasma da hemolinfa e os hemócitos apresentam atividade antimicrobiana, porém o mecanismo pelo qual os hemócitos são ativados para liberarem essas moléculas de defesa na resposta *in vivo* à invasão de vários patógenos ainda é desconhecido (ZHU et al., 2005).

Outra importante resposta imunológica dos invertebrados é o sistema profenoloxidase, que é um sistema de reconhecimento não-específico que parece ser mais eficiente que o dos vertebrados. Como resultado do sistema de ativação da profenoloxidase, uma enzima catalisa a oxidação de mono e difenois a ortoquinonas e há a deposição de melanina (reação conhecida como melanização) sobre a superfície de parasitas invasores na hemolinfa ou no exoesqueleto (TANG et al., 2006; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Além do papel fundamental na resposta imune imediata, a melanina participa da cicatrização de feridas, esclerotização da cutícula e pigmentação, bem como na formação de nódulos e cápsulas em alguns insetos (LAVINE; STRAND, 2003; YASSINE; OSTA, 2010). Em carrapatos, Zhioua et al., (1997) não detectaram nenhuma atividade da fenoloxidase em *Dermacentor variabilis*, *Ixodes*

scapularis e *A. cajennense* e concluíram que a profenoloxidase não atua como uma opsonina nessas espécies de carrapatos. No entanto, Kadota et al., (2002) detectaram atividade da fenoloxidase no quarto instar ninfal de *Ornithodoros moubata*. A atividade da fenoloxidase na hemolinfa de carrapatos ixodídeos precisa ser estudada levando-se em consideração a instabilidade das fenoloxidases durante as análises (MARTIN et al., 1995).

A coagulação é fundamental para limitar a perda de hemolinfa e iniciar a cicatrização de feridas tanto em insetos quanto em vertebrados. É também uma importante defesa imune, pois forma rapidamente uma barreira secundária à infecção, imobilizando as bactérias e promovendo assim a sua morte (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). O mecanismo de coagulação da hemolinfa é ativado por uma cascata de serina-proteases, semelhantes às do sistema profenoloxidase, porém esta reação é independente da melanização (SCHERFER et al., 2004). Essas proteases possuem funções homólogas aos componentes do sistema complemento e aos fatores de coagulação dos mamíferos (SILVA et al., 2000).

Em estudos realizados com carrapatos, proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana envolvidos na resposta imune já foram identificados no plasma da hemolinfa, nos hemócitos, no intestino e nos ovos (CRUZ et al., 2010; ESTEVES et al., 2009; FOGAÇA et al., 1999, 2004, 2006; JOHNS et al., 2001b; NAKAJIMA et al., 2001; 2002; RUDENKO et al., 2007; SONENSHINE; HYNES, 2008). O entendimento dos mecanismos de defesa deste parasito poderá contribuir na identificação de alvos para o controle eficaz além de responder algumas questões como o porquê dos carrapatos transmitirem alguns microorganismos e outros não e o porquê de algumas espécies serem vetores competentes e outras não (TAYLOR, 2006).

2.4 Hemolinfa

O fluído circulante no corpo do carrapato é chamado de hemolinfa, que consiste de plasma (hemolinfa livre de hemócitos) e de células (hemócitos). O plasma da hemolinfa é um fluido aquoso, rico em proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídeos, hormônios e vários sais. Atua como veículo no transporte de mensageiros hormonais, livres ou ligados a proteínas carreadoras, bem como no transporte de nutrientes e produtos do metabolismo celular (SONENSHINE, 1991). Também funciona como um meio osmoticamente balanceado que banha células e tecidos, além de estabelecer os mecanismos de coagulação, auxiliando na formação de coágulos da hemolinfa quando a cutícula do carrapato é lesionada (SONENSHINE, 1991). Poucos estudos demonstram o volume estimado de hemolinfa presente no corpo de carrapatos; esse valor variou de 3 a 4 μL em fêmeas adultas não alimentadas de *Dermacentor andersoni* e de 100 a 150 μL em fêmeas totalmente ingurgitadas, isto é, cerca de 23% do seu peso (KAUFMAN; PHILLIPS, 1973).

Os hemócitos são os principais componentes da hemolinfa, constituindo cerca de 50% a 60% de seu conteúdo (SONENSHINE, 1991). Estimativas do número de hemócitos na hemolinfa de carrapatos variam de 5.000 a 73.000/ mm^3 (WOOLLEY, 1988). De acordo com o sistema proposto por Binnington e Obenchain (1982), os carrapatos possuem 5 classes de hemócitos, conhecidas como pro-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos (tipo I e II), esferulócitos e oenocitóides, sendo os quatro primeiros os tipos celulares mais encontrados na hemolinfa. Zhioua et al. (1996) relataram que os hemócitos têm um papel dominante na resposta imune do carrapato, onde os plasmatócitos são responsáveis pela fagocitose (KUHN; HAUG, 1994) e os granulócitos pelo encapsulamento de organismos maiores (EGGENBERGER et al., 1990).

A quantidade de hemócitos circulantes bem como os tipos de hemócitos é essencial para a imunidade dos artrópodes e seu número diminui drasticamente na hemolinfa durante uma infecção (RUSSO et al., 2001). Paralelamente, novos hemócitos vão sendo produzidos para balancear a perda destas células na hemolinfa (MARMARAS; LAMPROPOULOU,

2009). Estudos realizados por Silva et al., (2006a; 2006b) mostraram uma redução no número dos hemócitos presentes na hemolinfa de *R. microplus* quando submetidos à infecção por *B. bassiana*, demonstrando o efeito tóxico/imunossupressor deste entomopatógeno ao longo dos dias após infecção.

2.5 Proteínas Presentes na Hemolinfa

As proteínas constituem o principal componente solúvel do plasma da hemolinfa e provavelmente têm um papel importante na regulação da pressão osmótica. Cerca de 30 bandas de diferentes proteínas foram identificadas através de eletroforese uni ou bidimensional e/ou técnicas de focalização isoelétricas na hemolinfa de carrapatos (SCHRIEFER, 1991), e as duas proteínas mais abundantes foram identificadas como hemeglicolipoproteínas (vitelogenina e vitelina) que estão associadas com a vitelogênese (BINNINGTON; OBENCHAIN, 1982).

A síntese, composição, distribuição, propriedades e caracterização do desenvolvimento das principais proteínas da hemolinfa de carrapatos são pouco estudadas quando comparado aos insetos e outros artrópodes, sendo a vitelogenina a proteína mais estudada (KOPACEK et al., 2000; THOMPSON et al., 2007).

Em geral, a composição de carboidratos, lipídeos e aminoácidos da vitelina é similar em insetos e em carrapatos (CHINZEI, et al., 1983; GUDDERRA et al., 2001) e as hemoproteínas semelhantes à vitelogenina derivam seu heme da digestão da hemoglobina do sangue do hospedeiro (O'HAGAN, 1974). Proteínas encontradas na hemolinfa também ocorrem na glândula salivar e saliva de *Rhipicephalus appendiculatus* (WANG; NUTTALL, 1994).

Em insetos e em carrapatos, a vitelogenina circula na hemolinfa e é a precursora da vitelina (GUDDERRA et al., 2002a). Para que a vitelogênese ocorra, feromônios do macho são transferidos para o trato genital da fêmea durante a fecundação, iniciando o aumento da ingestão de sangue para que ocorra a repleção da fêmea e a vitelogênese (ROE et al., 2008). A vitelogenina é sintetizada pelo corpo gorduroso, liberada na hemolinfa, absorvida pelos oócitos via endocitose mediada por receptores e então é armazenada como vitelina no interior dos ovos, atuando como fonte nutricional para o desenvolvimento do embrião (JAMES; OLIVER, 1999).

Segundo Thompson et al. (2007), a vitelogenina é também sintetizada pelo intestino médio e em menor quantidade pelos ovários de fêmeas nos períodos de pré-postura e postura. A vitelogenina não se acumula na hemolinfa, por isso é uma das proteínas encontradas em menor quantidade na hemolinfa de fêmeas de ixodídeos (cerca de 11% da proteína total) devido à absorção rápida e contínua pelos oócitos em maturação (SONENSHINE, 1991). Em *D. variabilis*, a concentração de vitelogenina aumentou 170 vezes antes do ingurgitamento rápido, atingindo o pico com aproximadamente 7 dias após alimentação (ROSELL; COONS, 1991), enquanto que em *Hyalomma dromedari*, o pico se deu 4 dias após o ingurgitamento (SCHRIEFER, 1991).

Outra classe de proteínas conhecidas como lectinas, com peso molecular de 70-1.500 kDa, (GILLESPIE et al., 1997) foram identificadas em *O. moubata* (KOVAR et al., 2000) e *Ixodes ricinus* (GRUBHOFFER et al., 1991). Em artrópodes, essas glicoproteínas são produzidas e secretadas na hemolinfa principalmente pelos hemócitos e pelas células do corpo gorduroso (GUDDERRA, et al., 2002a). As lectinas apresentam proteínas com afinidade por carboidratos e estão relacionadas a vários fenômenos de reconhecimento celular, incluindo adesão a hemócitos e microorganismos. Desta forma, desempenham um importante papel na imunidade dos artrópodes, funcionando como opsoninas, proteínas que se ligam a partículas antigênicas e facilitam sua fagocitose, ao se aderirem aos organismos invasores.

No plasma da hemolinfa de *O. moubata* foi identificado um novo membro da família dos inibidores de proteases α -2-macroglobulinas (α 2M) (KOPACEK et al., 2000), atuando como inibidor universal de diferentes classes de proteases em invertebrados (HOFFMANN et al., 1999). Em geral, os inibidores de proteases participam do mecanismo de defesa contra patógenos através do controle da cascata de profenoloxidase (ASO, et al., 1994) ou inibindo proteases de bactérias e fungos (NIRMALA et al., 2001).

As serina-proteinases e seus inibidores (Serpinas) têm sido descritas como importantes reguladores na resposta imune de insetos, juntamente com os peptídeos antimicrobianos (GORMAN; PASKEWITZ, 2001). Altas concentrações de serpinas são encontradas na hemolinfa de vários artrópodes, logo estes inibidores são ferramentas importantes para o entendimento da resposta imune (AZZOLINI et al., 2004). Em *D. melanogaster* possivelmente um conjunto de serina-proteinases sejam induzidas em infecções que ocorrem através da cutícula, como acontece com as infecções causadas por fungos entomopatogênicos. Além disso, a infecção por *B. bassiana* também induz a expressão de diferentes serpinas neste inseto (ROXSTROM-LINDQUIST et al., 2004).

A principal proteína da hemolinfa de *D. variabilis* foi identificada por Gudderra et al. (2001) como sendo uma hemelipoglicoproteína, composta por colesterol, fosfolipídeos, monoacilglicerídeos, triacilglicerídeos e ácidos graxos livres, compreendendo cerca de 60-80% das proteínas total da hemolinfa de fêmeas parcialmente alimentadas. Nesta espécie de carrapato, a proteína carreadora lipoglicoheme parece funcionar como uma biliproteína que seqüestra heme. Ainda segundo esses autores, esta proteína está presente no homogenato total dos ovos, das larvas alimentadas e não alimentadas e das ninfas alimentadas, bem como no plasma de adultos alimentados e não alimentados, incluindo fêmeas em postura.

Gudderra et al (2002b) também encontraram esta proteína carreadora lipoglicoheme no corpo gorduroso, glândula salivar, músculo e ovário, bem como na hemolinfa de fêmeas de *D. variabilis* parcialmente e totalmente alimentadas. A concentração desta proteína variou nos tecidos de fêmeas de *D. variabilis* durante a alimentação, indicando diferença na expressão, fixação e/ou utilização desta proteína carreadora durante a vitelogênese. Em machos e fêmeas adultos de *Ornithodoros parkeri*, a lipoproteína não foi detectada no corpo gorduroso e na glândula salivar, mas foi abundante no líquido coxal.

Em insetos, o conhecimento das proteínas predominantes na hemolinfa é mais avançado. A lipoproteína lipoforina está amplamente distribuída entre as diferentes ordens: Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Orthoptera, Isoptera, Dictyoptera, Hymenoptera e Lepidoptera (SEVALA et al., 1999). A principal função da lipoforina é o transporte de lipídeos na hemolinfa de insetos (WEERS; RYAN, 2006), sendo os fosfolipídeos e o diacilglicerol os componentes lipídicos mais abundantes desta proteína (SUN et al., 2000). Além de fosfolipídeos e diacilglicerol, a lipoforina liga feromônios, hidrocarbonos, retinóides e agentes hemostáticos (SUN et al., 2000).

Na hemolinfa de crustáceos foram identificados dois tipos de lipoproteínas que transportam lipídeos e proteínas dos sítios de absorção para os locais de utilização. Algumas destas lipoproteínas estão envolvidas no reconhecimento imunológico e na coagulação (PLASCENCIA et al., 2000).

Em *R. microplus*, a principal proteína da hemolinfa foi caracterizada como uma hemelipoproteína (HeLp) por Maya-Monteiro et al. (2000) e aparentemente é análoga a lipoglicohemeproteína de *D. variabilis* (GUDDERRA, et al., 2002a). HeLp é uma glicolipoproteína com peso molecular de 354 KDa e com duas subunidades (103 KDa e 92 KDa); contém 3% de carboidratos e 33% de lipídeos (lipídeos neutros e fosfolipídeos). Uma relevante característica da HeLp é a abundância de colesterol esterificado (35% dos lipídeos totais), que ainda não havia sido relatado em lipoproteína de invertebrados (MAYA-MONTEIRO et al., 2000). É a principal hemelipoproteína da hemolinfa de machos e fêmeas

de *R. microplus*, porém ausente nos ovos; está envolvida no transporte e no reaproveitamento do grupo prostético heme, uma vez que *Rhipicephalus* não tem uma via de síntese de heme funcional e utiliza exclusivamente o heme obtido da digestão do sangue do hospedeiro vertebrado para fazer suas próprias hemeproteínas (BRAZ, et al., 1999).

Johns et al. (1998) identificaram uma lisozima na hemolinfa de fêmeas de *D. variabilis* desafiadas com *Bacillus subtilis*. Essa proteína, com peso molecular de aproximadamente 14,5 kDa, apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas. As lisozimas são importantes na resposta imune contra a invasão de organismos e podem ser secretadas pelo corpo gorduroso (GILLEPSIE et al., 1997) ou pelos hemócitos (CHENG et al., 1979).

Outra classe de proteína encontrada na hemolinfa de carrapatos são as imunoglobulinas do hospedeiro. Cerca de 2% da concentração de imunoglobulina do soro de bovinos foi encontrada na hemolinfa de *R. microplus*, demonstrando que ocorre a passagem de imunoglobulinas funcionais do intestino para a hemolinfa de carrapatos (DA-SILVA VAZ et al., 1996).

Segundo Gudderra et al. (2002a) existem muitos trabalhos publicados com análises eletroforéticas de proteínas da hemolinfa de carrapatos, porém são apenas observações gerais que caracterizam seu peso molecular com poucas informações sobre a bioquímica dessas proteínas e suas possíveis funções.

O entendimento do papel das proteínas da hemolinfa no desenvolvimento, reprodução, defesa contra patógenos e endocrinologia do carrapato é essencial para o entendimento da fisiologia do carrapato e auxiliará na descoberta de novos alvos para o controle de carrapatos, facilitando o desenvolvimento de carrapaticidas (GUDDERRA et al., 2002a).

2.6 Peptídeos Antimicrobianos

Em algumas reações de defesa, uma série de substâncias que estão presentes em pequenas quantidades na hemolinfa ou que aparecem durante o curso de uma infecção, têm sua síntese estimulada. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) fazem parte dos mecanismos de defesa humoral e estão muito bem caracterizados em insetos, porém pouco entendido em aracnídeos (HETRU et al., 1998). Em geral, são moléculas pequenas de até 5 kDa, convencionalmente descritas como catiônicas, anfipáticas e que exibem alto teor de aminoácidos básicos e pelo menos 50% de aminoácidos hidrofóbicos. Apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e parasitas, portanto desempenham um importante papel na imunidade inata (MOOKHERJEE; HANCOCK, 2007). Mais de 1000 PAMs já foram descritos em plantas, vertebrados e invertebrados (JURETIC, 2009), sendo a maioria proveniente de insetos (BACHÈRE et al., 2004).

O principal modo de ação destas moléculas é através da sua inserção na membrana celular, causando destruição ou permeabilização dessas membranas, culminando na morte do microorganismo. Alternativamente, os peptídeos podem se ligar a um receptor da membrana, levando a uma perda específica da sua função. Além disso, ao se translocarem através da membrana, essas moléculas podem atuar intracelularmente, impedindo a síntese de metabólitos importantes para o microorganismo (SHAI, 1999; SILVA JR et al., 2000). Logo, por atuarem em diferentes compartimentos celulares e por apresentarem excelente atividade antimicrobiana, essas moléculas se tornam candidatas promissoras para o desenvolvimento de drogas importantes no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (LOHNER, 2001; HANCOCK et al., 2006).

Além da diversidade de estrutura e do modo de ação, o local e a regulação da síntese dos PAMs também difere entre os grupos de artrópodes. Em insetos, a síntese de PAMs pode ser uma resposta imune local, ocorrendo na epiderme e nos tratos reprodutivo, respiratório e

digestivo, sendo esta expressão constitutiva ou induzida por uma infecção microbiana (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). A síntese de PAMs pode estar relacionada a uma resposta imune sistêmica, onde esses peptídeos são sintetizados principalmente pelo corpo gorduroso e hemócitos e sua transcrição genética é fortemente induzida após uma lesão e/ou infecção (BULET et al., 1999). Nos insetos holometabólicos (que apresentam metamorfose completa) os PAMs são produzidos rapidamente e transitoriamente pelo corpo gorduroso e várias células epiteliais (BULET et al., 2003) enquanto que em insetos hemimetabólicos (que apresentam metamorfose incompleta), os AMPs são produzidos pelos hemócitos e secretados na hemolinfa após infecção (LAMBERTY et al., 2001). Em contrapartida, a síntese de PAMs em quelicerados parece ser constitutiva e ocorre principalmente nos hemócitos, onde permanecem armazenados em grânulos antes de serem liberados na hemolinfa após estímulo microbiano (IWANAGA, 2002).

Esses peptídeos antimicrobianos têm sido divididos em várias categorias, nas quais, as mais importantes são as defensinas, cercropinas, atacinas e sarcotoxinas (COCIANCICH et al., 1994; LOWENBERGER et al., 1995). As cercropinas são pequenos peptídeos que apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Atacinas e sarcotoxinas são polipeptídeos (> 20 kDa) que apresentam mais atividade bacteriostática do que bactericida (COCIANCICH et al., 1994). Já as defensinas podem ser classificadas em duas sub-famílias em relação à atividade *in vitro* contra bactéria e fungos filamentosos: defensinas antibacterianas e defensinas antifúngicas (predominantemente efetivas contra fungos filamentosos). No entanto, as defensinas com propriedades antifúngicas são pouco relatadas (BULET et al., 2003), entre elas podemos citar a drosomicina (FEHLBAUM et al., 1994), galerimicina (SCHUHMANN et al., 2003) e termicina (BARBAULT et al., 2003). O pequeno número de descrições na literatura não reflete a falta de peptídeos antifúngicos produzidos pelos insetos mas a falta de pesquisa sobre tais moléculas (BULET; STACKLIN, 2005).

As defensinas têm sido identificadas em mamíferos (KLAUDINY et al., 2005), insetos (YE et al., 2010), plantas (WU et al., 2011) e em carrapatos (TAYLOR 2006), atuando como moléculas efetoras da imunidade inata. Mais de 20 defensinas têm sido identificadas em 11 espécies de carrapatos (SONENSHINE; HYNES 2008), apresentando algumas espécies múltiplas isoformas da defensina (NAKAJIMA et al., 2001; 2002; RUDENKO et al., 2007). As defensinas são produzidas como uma pre/pro-forma, que é clivada em um local altamente conservado (RVRR), para liberação do peptídeo “maduro” (SONENSHINE; HYNES, 2008). A primeira defensina reconhecida a partir de um ixodídeo foi a varisina, produzida pelos hemócitos de *D. variabilis* após desafio microbiano (JOHNS et al., 2001a,b). Embora a transcrição tenha sido detectada em vários tecidos (SONENSHINE et al., 2005; CERAUL et al., 2007), o peptídeo foi observado apenas na hemolinfa/hemócitos (SONENSHINE; HYNES 2008).

No intestino de carrapatos, o principal componente do sistema imune é o fragmento antimicrobiano (Hb 33-61) gerado a partir da atividade proteolítica endógena (FOGAÇA et al., 1999). Cisteíno-proteinase e proteinase aspártica atuam na proteólise da hemoglobina e geram hemocidinas, que podem participar dos mecanismos de defesa contra microorganismos no intestino de *R. microplus* (CRUZ et al., 2010).

Peptídeos antimicrobianos purificados de diversas espécies animais apresentam características desejáveis a uma nova classe de antibióticos, no entanto, alguns problemas precisam ser resolvidos para serem produzidos em escala industrial: 1- apresentam massa molecular relativamente grande quando comparados aos antibióticos comerciais, logo, deverão ser produzidos por técnicas de biologia molecular para a obtenção de moléculas recombinantes e com baixo custo (HANCOCK; LEHRER, 1998); 2- alguns peptídeos antimicrobianos são tóxicos para células de mamíferos (essa característica poderia ser

revertida por modificações químicas na estrutura dessas moléculas); e 3- a instabilidade desses peptídeos às proteases do nosso organismo (existem estratégias que protegem os peptídeos contra proteases, tais como a de incorporá-los em lipossomos ou a de usar modificações químicas) (HANCOCK; SCOTT, 2000).

Portanto, os peptídeos antimicrobianos são importantes não somente como componentes do sistema imune inato de invertebrados participando do combate às infecções, mas seus análogos químicos ou recombinantes apresentam grande potencial para serem aplicados como antibióticos no combate a microorganismos resistentes aos antibióticos convencionais (HANCOCK; SCOTT, 2000).

2.7 Lipídeos

Os lipídeos definem um conjunto de substâncias químicas que, ao contrário das outras classes de compostos orgânicos, não são caracterizadas por algum grupo funcional comum, e sim pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água. Fazem parte de um grupo conhecido como biomoléculas e se encontram distribuídos em todos os tecidos, principalmente nas membranas celulares e nas células de gordura. Os lipídeos têm muitas funções no sistema biológico, energético e estrutural e a principal delas está na formação da permeabilidade da barreira de células e organelas subcelulares sob a forma de uma bicamada lipídica. Embora o principal tipo de lipídeos que define essa bicamada em quase todas as membranas seja o fosfolípídeo baseado em glicerol, outros lipídeos são componentes importantes e variam em sua presença e quantidade em todo o espectro de organismos (VANCE; VANCE, 2002).

Desempenham um papel crítico durante o processo inflamatório agudo, tanto na capacidade pró-inflamatória quanto anti-inflamatória. Dentre eles, podemos citar a lisofosfatidilcolina, ceramida e esfingolípídeos. A lisofosfatidilcolina, um metabólito intermediário de fosfatidilcolina e o principal componente fosfolípídeo de células eucarióticas e procarióticas, tem desempenhando um papel importante na proliferação celular, mitogênese de macrófagos, ativação dos linfócitos T e quimiotaxia de monócitos. Esses lipídeos bioefetores são gerados como produtos de clivagem de fosfolípídeos na membrana celular pela ação de fosfolipases, ativadas em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares, tais como peptídeos bacterianos, citocinas, fatores de crescimento, complexos imunes IgE e trauma mecânico (GOLODNE et al., 2003; CABRAL, 2005).

O conhecimento de lipídeos, a sua função e o modo de utilização pelo tecido são melhor estudados em insetos do que em carrapatos. O sucesso dos insetos no planeta tem sido atribuído à sua capacidade de utilizar os lipídeos eficientemente como substrato para a reprodução, a embriogênese, a metamorfose, o vôo, a regulação de uma variedade de processos fisiológicos (hormônios), proteção contra a dessecação do ambiente (lipídeos da cutícula formam uma barreira impermeável à água) e contra a ação de predadores e infecções microbianas, bem como componentes das membranas celulares (GILBERT; CHINO, 1974). O lipídeos atuam na sinalização intracelular, no transporte intracelular e na transcrição gênica (STEHR et al., 2004). Diversas substâncias constituem este importante grupo de moléculas como gorduras, ácidos graxos, óleos, algumas vitaminas e hormônios.

Por serem componentes estruturais das membranas biológicas, alterações no número e composição destes lipídeos podem ocorrer quando há alterações no estado metabólico em resposta a fatores de estresse (STUART et al., 1998). Em caramujos, os lipídeos estão envolvidos na sobrevivência dos animais em condições de estresse fisiológico, como longos períodos de restrição alimentar ou quando são parasitados. Quando as reservas de carboidratos são rapidamente esgotadas, os lipídeos são consumidos com maior frequência e há alterações

qualitativas e quantitativas em diferentes tipos de lipídeos (BANDSTRA et al., 2006; MULLER et al., 2000).

Os lipídeos neutros na forma de triacilglicerídeos (TG) são a forma predominante de armazenamento de ácidos graxos e compreendem a principal reserva de energia em todos os animais (WOLINS et al., 2006). Os insetos acumulam TG como gotículas de lipídeos no interior do citoplasma das células do corpo gorduroso durante o período de alimentação, e dependem dessas reservas para suprir as necessidades de energia associadas a períodos em que não há alimentação, ao vôo e a oogênese (CANAVOSO et al., 2001; ARRESE; SOULAGES, 2010). A mobilização desses lipídeos (lipólise) é induzida por dois tipos de hormônios: o hormônio adipocinético (AKH), que ativa o inositol-3-fosfato e a sinalização de AMPc, e a octopamina (CANAVOSO et al., 2001; ARRESE et al., 2010).

Além destas funções, os lipídeos apresentam atividade contra microorganismos gram-positivos e gram-negativos. A utilização clínica de lipídeos antimicrobianos foi sugerida há muitos anos por vários autores (KABARA et al., 1972; SANDS et al., 1978). No entanto, nenhum dos produtos farmacêuticos contendo lipídeos como compostos ativos ainda foi aprovado para uso clínico como drogas profiláticas ou terapêuticas contra infecções bacterianas (RAVICHANDRAN et al., 2009).

Em síntese, os lipídeos atuam na sinalização da resposta imune e podem ser usados como fonte de energia e/ou para a biogênese de membranas nos locais de infecção ou nos hemócitos, porém a natureza dos sinais que desencadeiam a mobilização de lipídeos durante as infecções e o destino dos lipídeos mobilizados ainda não são totalmente conhecidos (ARRESE; SOULAGES, 2010).

2.8 Corpo Gorduroso

Em carrapatos, o corpo gorduroso é um órgão difuso, consistindo de muitos cordões de células ligados aos ramos do sistema traqueal e ocasionalmente a outros órgãos, contrastando com o dos insetos, que é um órgão concentrado na região abdominal. As células do corpo gorduroso são abundantes ao redor dos troncos traqueais, especialmente próximos da sua origem com os espiráculos respiratórios (SONENSHINE, 1991). Segundo Obenchain e Oliver (1973) o corpo gorduroso é dividido em duas regiões: central, ao redor do sistema reprodutivo e outros órgãos internos; e região periférica, ao redor dos troncos traqueais, traquéia, tecido conectivo e disperso entre a epiderme. No entanto, Denardi et al. (2008) sugeriram outra terminologia para descrever a localização deste tecido: corpo gorduroso parietal, substituindo o termo periférico e perivisceral, substituindo o termo central.

Essa diferenciação regional determina diferentes funções, uma vez que o corpo gorduroso periférico apresenta indícios de grânulos de glicogênio, indicativo de papel de armazenamento, enquanto o central mostra evidências de atividade biosintética (KEELEY, 1985). No entanto, o corpo gorduroso em fêmeas de carrapatos é altamente ativo após a alimentação e fecundação (SONENSHINE, 1991).

O corpo gorduroso em artrópodes é o órgão que armazena as reservas nutricionais, metaboliza hormônios e outras moléculas mensageiras essenciais, além de detoxificar resíduos ou compostos nocivos. Apresenta um papel vital na reprodução, sintetizando e secretando vitelogenina durante a fase reprodutiva da vida dos artrópodes. Segundo Wigglesworth (1967) seu valor funcional para os artrópodes é comparado ao fígado em vertebrados. Além disso, é considerado um importante tecido de estoque de lipídeos, análogo ao tecido adiposo em mamíferos (SONENSHINE, 1991).

Constitui uma porcentagem considerável do peso dos insetos (mais de 50% em alguns casos) e é derivado do mesoderma somático durante a embriogênese. Devido ao seu grande tamanho e sua localização na hemocele do inseto, o corpo gorduroso é o principal tecido

relacionado à imunidade, pois é responsável pela síntese e secreção de peptídeos na hemolinfa, onde atinge concentrações eficazes (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). A quantidade dos vários substratos extraíveis do corpo gorduroso depende da principal fonte de energia (carboidratos ou lipídeos) usada para o desenvolvimento ou outros processos fisiológicos dos artrópodes, aumentando durante o período de alimentação e diminuindo com a parada da alimentação ou quando os lipídeos são usados durante processos metabólicos, como o vôo e a oogênese (GILBERT; CHINO, 1974; STEELE, 1985). Beenackers et al. (1984) enfatizaram que o rápido acesso entre este órgão e a hemolinfa (já que o corpo gorduroso é banhado pela hemolinfa) é vital para o organismo dos artrópodes se ajustar apropriadamente às mudanças na concentração de precursores de energia na circulação, especialmente sob condições de extrema demanda energética, como o vôo e a oogênese.

Estudos realizados por Denardi et al (2009) mostraram grande quantidade de lipídeos nos trofócitos parietal e perivisceral do corpo gorduroso de *A. cajennense*, principalmente na mitocôndria, sugerindo que esta organela desempenhe um papel importante na produção de lipídeos nos trofócitos. Além disso, o retículo endoplasmático liso, responsável pela síntese de lipídeos nas células, não foi frequentemente observado.

Denardi et al. (2004) mostraram que os grânulos da gema do ovo de *A. cajennense* é composta basicamente de glicolipoproteínas, sendo as macromoléculas depositadas na seguinte ordem: lipídeos, proteínas e carboidratos, podendo ser encontrados na forma livre ou ligados a outros componentes. Esses autores contradizem Balashov (1983), que mostrou que os grânulos da gema do ovo de carrapatos era composta apenas de lipídeos e proteínas. Portanto, além da vitelogenina, os lipídeos são sintetizados e/ou armazenados no corpo gorduroso e direcionados, via hemolinfa, para a vitelogênese e outros processos fisiológicos (como o vôo e a metamorfose em insetos) e o estresse provocado por infecções podem alterar sua quantidade na hemolinfa.

2.9 Lipases

Lipases são enzimas que atuam sobre lipídeos, catalizando diversas reações químicas que estas moléculas possam sofrer. São classificadas como hidrolases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) e atuam na hidrólise de triacilgliceróis formando ácidos graxos livres e glicerol. As lipases têm sido definidas como carboxilesterases, que hidrolisam acilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono, enquanto que as enzimas que hidrolisam acilgliceróis compostos de ácidos graxos de cadeia curta (menos de dez átomos de carbono) são reconhecidas como esterases-carboxil éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3 (CASTRO-OCHOA et al., 2005).

Apresentam considerável importância fisiológica e comercial, constituindo um dos mais importantes grupos de biocatalisadores com aplicação biotecnológica, utilizadas na síntese de biopolímeros e biodiesel, produção de produtos farmacêuticos e agro-químicos (JAEGER; EGGERT, 2002; REIS et al., 2009). A maioria das lipases comerciais é de origem microbiana (destacando-se alguns fungos filamentosos) pelo baixo custo de extração, estabilidade térmica e de pH, especificidade de substratos e atividade em solventes orgânicos (SAXENA et al., 2003). Em humanos, têm sido sugeridas como medicamentos potentes para o tratamento da obesidade e outras doenças em função da sua atividade moduladora (PARK, 2001).

Além das diversas possibilidades de aplicação industrial e importância fisiológica, é crescente a evidência de que as lipases são importantes fatores de virulência microbiana, estando envolvidas nos processos de infecção de bactérias (LU et al., 2009), fungos (STEHR et al., 2004) e do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* (SILVA et al., 2005; SILVA et al., 2009).

Lipídeos esterificados formados a partir de álcoois e ácidos graxos são os principais substratos para a ação das lipases e podem variar muito em sua composição, podendo ser mono, di ou triacilgliceróis ou ainda moléculas lineares, cíclicas ou alifáticas. Os produtos gerados a partir desta ação podem desencadear processos fisiológicos importantes, seja em reações endógenas, em relações ecológicas ou deletérias, como no caso de infecções microbianas. Em insetos, os lipídeos são liberados na hemolinfa sob a forma de diacilglicerol (DAG) pela lipase e transportados para os músculos de vôo por lipoproteínas (lipoforina). Nos músculos de vôo, o DAG é hidrolisado e os ácidos graxos liberados e oxidados para fornecer energia (RYAN; VAN DER HORST, 2000). Em carrapatos, Fahmy et al., (2004) sugeriram que enzimas lipolíticas (esterases e lipases) possam desempenhar um papel central na interconversão de lipovitelininas durante a embriogênese de *H. dromedarii*.

Numerosos métodos podem ser usados para medir a atividade hidrolítica bem como para detecção das lipases, dentre eles, podemos citar titrimetria, espectroscopia (fotometria, fluorimetria, infra-vermelho), cromatografia, radioatividade, tensiometria interfacial, turbidimetria, condutimetria, imunoquímica e microscopia (BEISSON, et al., 2000). Convencionalmente, a atividade lipásica é determinada por métodos colorimétricos a partir da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. A formação do *p*-nitrofenol (produto da hidrólise), que apresenta coloração amarela, é quantificada em espectrofotômetro a 410 nm (WINKLER; STUCKMANN, 1979).

O método colorimétrico baseado na reação entre o ácido 5,5'ditiobis (2-nitro-benzóico) (DTNB) e o produto da hidrólise de 2,3-dimercapto-1-propanol tributirato (DMPTB) foi descrito por Kurooka et al., (1977) e posteriormente modificado para a determinação da especificidade posicional de lipases não específicas e 1,3 específicas (FARIAS et al., 1997). Recentemente, este método foi otimizado por Choi et al., (2003) para o formato de microplacas, possibilitando a determinação simultânea da atividade lipásica de muitas amostras, além de apresentar outras vantagens como ser mais simples e mais sensível que o método convencional titrimétrico. Segundo Beisson et al., (2000) não existe nenhum método único e universal para determinar a atividade da lipase, haja visto que existem diferentes técnicas. Portanto, a escolha de um determinado método dependerá dos requerimentos específicos de cada usuário.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização dos Experimentos

Os bioensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária (LCM) localizado na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A eletroforese bidimensional foi realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteômica (LAMMP), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As análises proteômicas foram realizadas na Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica (UEMP) do Instituto de Bioquímica Médica (IBqM), UFRJ e no Laboratório de Toxinologia e Proteoma da FIOCRUZ. As corridas de CLAE foram realizadas no laboratório de Bioquímica de Insetos, do IBqM, UFRJ.

3.2 Obtenção de Carrapatos

Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* foram coletadas de bovinos sem contato recente com carrapaticidas químicos (no mínimo 30 dias) e mantidas em temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa (UR) $\geq 80\%$ no LCM para realização de postura. No 10º dia de postura, alíquotas de 300 mg de ovos foram colocadas em seringas de plástico, cujas extremidades foram cortadas e vedadas com uma rolha de algodão hidrófilo e mantidas nas condições de temperatura e umidade descritas acima. As larvas provenientes dessas alíquotas foram utilizadas para a infestação de bezerros estabulados. Após 21 dias, fêmeas ingurgitadas foram coletadas do piso das baias e levadas ao laboratório para assepsia da cutícula com solução de hipoclorito de sódio a 1%.

3.3 Obtenção e Manutenção dos Fungos

Os isolados dos fungos entomopatogênicos utilizados nos experimentos foram Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) e Bb 986 de *Beauveria bassiana*, cedidos pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP. O isolado DOA-23 do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* foi cedido pela Micoteca da BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa. A origem dos isolados fúngicos e seus hospedeiros/substrato estão relatados na tabela 1.

Os isolados fúngicos foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados a 25 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ durante 15 dias. Decorrido esse período, as placas foram armazenadas em refrigerador sob temperatura de 5 °C até a realização dos bioensaios.

Tabela 1. Isolados dos fungos utilizados nos bioensaios com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, suas respectivas espécies, hospedeiros, origens e ano de recebimento da cultura na ESALQ e na UFV.

Isolado	Espécie	Hospedeiro	Origem
Ma 959	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.*	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Rio de Janeiro-RJ
Bb 986	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i> (Acari: Ixodidae)	Piracicaba-SP
DOA 23	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Gossypium hirsutum</i> (Malvales: Malvaceae)	Chapadão do Sul-MS

* sensu lato

3.4 Preparo das Suspensões Fúngicas

Para realização das suspensões fúngicas, a superfície das colônias foi raspada com auxílio de um cabo e lâmina de bisturi para retirada dos conídios, que foram adicionados a 30 mL de água destilada estéril e Tween 80 0,1% (LUZ et al., 1998). As suspensões foram homogeneizadas e filtradas em gaze estéril para remoção de pequenos pedaços de meio de cultura. Uma amostra de cada suspensão foi colocada em Câmara de Neubauer e examinada sob microscópio óptico para a quantificação dos conídios segundo Alves (1998). As suspensões fúngicas foram ajustadas a concentração 10^8 conídios mL^{-1} .

3.5 Viabilidade dos Conídios

Uma alíquota de 10 μL da suspensão 10^8 conídios mL^{-1} dos isolados de *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* e *F. oxysporum* foi transferida para placas de Petri contendo BDA e cloranfenicol 0,5% e incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ durante 24 horas para observação da viabilidade dos conídios. O cálculo do percentual de germinação dos conídios foi realizado segundo ALVES (1998).

3.6 Delineamento Experimental

As fêmeas ingurgitadas foram submetidas a dois tratamentos: imersão ou inoculação. Para realização dos experimentos, cada grupo foi formado por 90 fêmeas ingurgitadas. Além da quantidade de fêmeas ingurgitadas, os grupos foram homogeneizados quanto ao peso.

3.6.1 Tratamento por imersão

No tratamento por imersão (IME), cada grupo de fêmeas ingurgitadas foi imerso em 20 mL da suspensão conidial durante três minutos. Decorrido este período, cada grupo de fêmeas ingurgitadas foi colocado em uma peneira estéril para remoção do excesso da suspensão conidial. Em seguida, as fêmeas do mesmo grupo foram mantidas em placa de Petri (150 mm x) e incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ até a coleta da hemolinfa. Para cada fungo dois grupos foram formados, sendo um grupo destinado a cada tempo de coleta (24 h e 48 h após o tratamento por imersão). O grupo controle (CTR) foi imerso somente em suspensão de

água destilada estéril e Tween 80 0,1%, e assim como no tratamento com os fungos, foram formados dois grupos, sendo um grupo para cada tempo de coleta.

3.6.2 Tratamento por inoculação

No tratamento por inoculação, as fêmeas ingurgitadas foram inoculadas com 5 μL da suspensão fúngica. Foram formados dois grupos controles: o grupo controle que recebeu como inóculo a solução de água destilada estéril e Tween 80 0,1% (denominado de grupo H_2O) e o grupo controle que recebeu apenas a injúria da picada da agulha, sem qualquer inóculo (denominado de grupo PICADO). A suspensão conidial ou suspensão controle foi inoculada na hemocele da fêmea ingurgitada no forame localizado entre o capitulo e o escudo dorsal, com auxílio de microscópio estereoscópico, e utilizando-se seringa Hamilton® (JOHNS et al., 1998).

3.7 Coleta da Hemolinfa

Após o tratamento, as fêmeas ingurgitadas foram incubadas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ até a coleta da hemolinfa. Para a coleta da hemolinfa, a superfície dorsal da cutícula das fêmeas ingurgitadas foi perfurada com auxílio de agulha de insulina 0,3 mm. Com uma suave pressão sobre o corpo do carrapato, a hemolinfa foi coletada com um capilar de vidro 0,3 mm acoplado a uma borracha flexível, que apresentava uma ponteira estéril em sua outra extremidade (Figura 2).

As amostras de hemolinfa foram colocadas em microtubos contendo 30 μL de coquetel de inibidores de protease (Inhibit® Sigma-Aldrich) e 82 μL de tampão salina (NaCl 1,5 M, EDTA 50 mM) acrescido de feniltiuréia e mantidas no gelo durante toda a coleta. Após a coleta, a hemolinfa foi centrifugada a $5040 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Os hemócitos foram separados do plasma e resuspenso em tampão fosfato (KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,47 mM; NaCl 136,89 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM pH 7,2) (GONDIM et al., 1989). O plasma da hemolinfa e os hemócitos foram mantidos a -80°C . As coletas foram realizadas 24 h e 48 h após o tratamento. A identificação dos grupos foi estabelecida conforme demonstrado na tabela 2. Amostras de hemolinfa contaminadas com sangue oriundo do extravazamento do conteúdo intestinal ou com alteração na coloração foram descartadas.

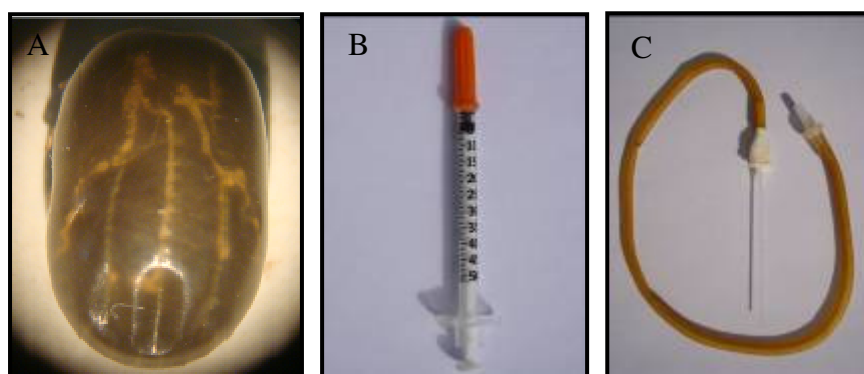


Figura 2. Material utilizado na coleta da hemolinfa. A: fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus microplus*; B: seringa ultrafine BD® utilizada para perfuração da cutícula; C: capilar de vidro acoplado a uma borracha flexível utilizado na coleta da hemolinfa.

Tabela 2. Identificação dos grupos de fêmeas ingurgitadas estabelecidos nos tratamentos por imersão ou inoculação.

Siglas	Descrição dos grupos
CTR 24 e CTR 48	Grupo controle de fêmeas ingurgitadas que não recebeu qualquer tratamento. Coletas realizadas 24 horas (h) e 48 h após o desprendimento natural do hospedeiro.
Ma IME 24 e Ma IME 48	Grupo de fêmeas ingurgitadas tratadas por imersão em suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. Coletas realizadas 24 h e 48 h após o tratamento, respectivamente.
Bb IME 24 e Bb IME 48	Grupo de fêmeas ingurgitadas tratadas por imersão em suspensão conidial de <i>Beauveria bassiana</i> . Coletas realizadas 24 h e 48 h após o tratamento, respectivamente.
Fo IME 24 e Fo IME 48	Grupo de fêmeas ingurgitadas tratadas por imersão em suspensão conidial de <i>Fusarium oxysporum</i> . Coletas realizadas 24 h e 48 h após o tratamento, respectivamente.
Picado 24 e Picado 48	Grupo controle de fêmeas ingurgitadas que recebeu somente a injúria da picada da agulha como tratamento. Coletas realizadas 24 h e 48 h após o tratamento, respectivamente.
H2O 24 e H2O 48	Grupo controle de fêmeas ingurgitadas inoculadas com água destilada estéril e Tween 80 0,1%. Coletas realizadas 24 h e 48 h após o tratamento, respectivamente.
Ma INO 24 e Ma INO 48	Grupo de fêmeas ingurgitadas inoculadas com suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. Coletas realizadas 24 h e 48 h após o tratamento, respectivamente.
Bb INO 24 e Bb INO 48	Grupo de fêmeas ingurgitadas inoculadas com suspensão conidial de <i>Beauveria bassiana</i> . Coletas realizadas 24 h e 48 h após o tratamento, respectivamente.
Fo INO 24 e Fo INO 48	Grupo de fêmeas ingurgitadas inoculadas com suspensão conidial de <i>Fusarium oxysporum</i> . Coletas realizadas 24 h e 48 h após o tratamento, respectivamente.

3.8 Dissecção dos Corpos Gordurosos

Para obtenção dos corpos gordurosos periféricos, as fêmeas ingurgitadas foram dissecadas em tampão fosfato pH 7,2 a 4 °C, sob microscópio estereoscópico. Após as dissecções, os corpos gordurosos de cada grupo foram mantidos em criotubos e em seguida armazenados a -196 °C. As dissecções foram realizadas 24 h e 48 h após o tratamento.

Os corpos gordurosos foram macerados em tampão fosfato pH 7,2 a 4 °C, centrifugados a 5040 × g durante 20 minutos e o infranatante foi separado e submetido às análises.

Somente as fêmeas ingurgitadas submetidas ao tratamento por inoculação com suspensões conidiais de *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* e *F. oxysporum* foram dissecadas. Além dos grupos inoculados com fungos, foram formados dois grupos controle: um grupo que não sofreu a injúria da inoculação (denominado CTR) e o outro grupo inoculado somente com água destilada estéril e Tween 80 0,1% (denominado H2O). Para cada tratamento, dois grupos foram formados, sendo um para cada tempo de dissecção, e cada grupo continha 10 fêmeas ingurgitadas com peso homogêneo.

3.9 Reisolamento dos Fungos após Bioensaios

Uma amostra de fêmeas ingurgitadas de cada tratamento foi colocada em câmara úmida para propiciar o crescimento fúngico sobre suas cutículas. Após sete dias, as colônias fúngicas que cresceram sobre a cutícula dos cadáveres das fêmeas foram semeadas em meio de cultura BDA acrescido de cloranfenicol (0,05%) e incubadas a 25 ± 1°C e UR ≥ 80% durante 15 dias. Decorrido esse período, foi realizada a avaliação das características micromorfológicas através da utilização da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula (RIVALIER; SEYDEL, 1932). As placas com as culturas foram mantidas sob as mesmas condições de temperatura e umidade durante 14 dias. Decorrido esse período, foram confeccionadas lâminas temporárias coradas em Lactofenol de Amman com azul de algodão (HAWKSWORTH, 1977) para a identificação dos fungos.

3.10 Dosagem de Proteínas

Para as dosagens de proteína total do plasma da hemolinfa, dos hemócitos e dos corpos gordurosos foi utilizado o método de Lowry modificado (MARKWELL et al., 1978), usando albumina sérica bovina (BSA) (Merck®) como padrão (Anexo A).

3.11 Quantificação de Hemócitos

Após a resuspensão dos hemócitos em 50 µL de tampão fosfato pH 7,2 foi realizada a contagem total dos mesmos com auxílio de Câmara de Neubauer sob microscópio óptico segundo Alves (1998).

3.12 Análise Estatística

Para análise dos dados referentes à quantidade de proteína total e número de hemócitos foi realizada análise de variância seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as médias em um nível de significância de 5% (p<0,05). Os grupos foram comparados em cada tempo de coleta.

3.13 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

3.13.1 Sob condições desnaturantes

Amostras do plasma da hemolinfa, dos hemócitos e do corpo gorduroso foram analisadas através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), de acordo com Laemmli (1970). Nos géis com tamanho de 15 cm x 20 cm foram aplicados 100 µg de proteína total da amostra, enquanto que nos mini-géis (10 cm x 8 cm) foram aplicados 30 µg de proteína total da amostra. O plasma da hemolinfa foi analisado em SDS-PAGE 10% e 15%, enquanto os hemócitos e corpo gorduroso foram analisados em SDS-PAGE 12% e SDS-PAGE 10%, respectivamente.

O padrão de peso molecular utilizado inclui as seguintes proteínas: miosina (198,844 Da), β-galactosidase (115,7 Da), albumina sérica bovina (96,743 Da), ovalbumina (53,541 Da), anidrase carbônica (37,134 Da), inibidor de tripsina (29,134 Da), lisozima (19,540 Da) e aprotinina (6,905 Da) (Bio-Rad®).

3.13.2 Sob condições nativas

Para eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes foi utilizado o sistema de tampões descontínuos de Davis (1964).

3.13.3. Corrida eletroforética

No gel de empacotamento 5% (Anexo B), as amostras foram submetidas à corrente de 80 V, 25 mA e 20 W. Quando o padrão de peso molecular se encontrou no limite entre o gel de empacotamento e o gel de corrida (Anexo C), a corrida foi realizada sob corrente de 100 V, 30 mA e 20 W.

3.13.4 Coloração dos géis

Os géis foram corados por “Coomassie Brilliant Blue R” (Coomassie Blue R-250 0,25%, metanol 45%, água destilada 45% e ácido acético 10%) e descorados em água e etanol 10% ou corados com nitrato de Prata (Anexo D). Os géis submetidos às análises proteômicas foram corados com Coomassie Blue Coloidal (Coomassie Blue G-250 0,1%, metanol 20%, sulfato de amônio 10% e ácido fosfórico 0,014%) e descorados apenas com água destilada.

3.14 Análise Proteômica (gel 1D)

3.14.1 Digestão com tripsina

Após a coloração dos géis com Coomassie coloidal, as bandas de interesse foram excisadas com lâmina de bisturi e colocadas em microtubos (Axygen®). As bandas foram lavadas (3 vezes) com 200 µL de bicarbonato de amônio 25mM (NH₄HCO₃) em 50% de acetonitrila (ACN) pH 8,0 e agitadas em vórtex durante 10 minutos. O excesso de solução foi retirado ao final de cada lavagem. Foi adicionado ditiotretol (DTT) 10 mM (aproximadamente 50 µL ou o volume suficiente para cobrir toda a superfície do gel) e em seguida, os microtubos foram incubados a 56 °C durante 1 h. A solução foi retirada e as bandas dos géis lavadas com NH₄HCO₃ 25 mM (± 200 µL). A solução foi retirada e as bandas foram alquiladas com 50 µL de iodoacetamida 55 mM. As amostras foram incubadas no escuro, em temperatura ambiente, durante 30 min. Após esse período, a solução foi retirada e

as bandas lavadas com NH_4HCO_3 25 mM. A desidratação das bandas de gel foi realizada com 100 μL de ACN 100% durante 5 min. A ACN foi retirada e a digestão do gel realizada com uma solução de tripsina (Promega®) preparada no gelo (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tripsina diluída em NH_4HCO_3 25 mM). As bandas de gel foram reidratadas com 15 μL da solução de tripsina e os microtubos mantidos a 4°C durante 10 min. Decorrido esse período, foi adicionado NH_4HCO_3 25 mM (\pm 50 μL ou o volume suficiente para cobrir toda a banda do gel) e os microtubos foram incubados a 37 °C durante 20 h.

Para a etapa de extração de peptídeos, o conteúdo do tubo (líquido + banda de gel) foi transferido para um novo tubo, constituindo assim a primeira extração de peptídeos. A esse conteúdo foi adicionado 50 μL de ACN 50% e TFA 5% e agitado suavemente durante 30 min. O líquido foi retirado (segunda extração) e adicionado à solução da primeira extração. Foi realizada a terceira extração de peptídeos, como descrito anteriormente. A solução resultante das três extrações teve o volume reduzido a 5 μL em um concentrador à vácuo (*speed vac*). Os peptídeos resultantes foram analisados por espectrometria de massas.

3.14.2 Espectrometria de massas – ESI-Q-TOF

Os peptídeos oriundos da hidrólise do gel (SDS-PAGE 12% de hemócitos) foram colocadas no Sistema Waters® nanoACQUITY UPLC® (Waters, Miliford, MA) através da coluna Waters Opti-Pak C18 acoplada ao Q-Tof MICRO® (Waters, Miliford, MA), instalado na UEMP-CCS, UFRJ. Os peptídeos gerados a partir da hidrólise foram fracionados por cromatografia líquida conjugada a um espectrômetro de massas com ionização por spray de elétrons (ESI-Q-TOF). O volume de injeção da amostra foi de 10 μL na coluna nanoEase C18 150 mm \times 75 μm (Waters, Miliford, MA) com eluição de 0,6 $\mu\text{L}/\text{min}$ e um gradiente linear 10-50% ACN com ácido fórmico a 0,1%. A voltagem do ESI foi de 3,5 kV com auxílio de uma agulha metálica. A temperatura da fonte foi 80 °C e a voltagem do cone de 100 V. O controle do instrumento e a aquisição de dados foram conduzidos pelo programa *MassLynx* (versão 4.0, Waters) e os experimentos realizados com varredura de razão massa-carga (m/z) de 200 a 2000 usando um tempo de varredura de 1 s durante todo o processo de cromatografia. Um número máximo de 3 íons com cargas +2, +3 e +4 foram selecionadas para MS/MS a partir de um único MS. Massas adicionais de Na^+ e K^+ foram automaticamente excluídas. O espectro MS/MS foi obtido da dissociação induzida por colisão (CID) usando o argônio como gás de colisão a uma pressão de 13 psi. A voltagem de colisão variou entre 18 e 45 V dependendo da massa do precursor. O íon de referência usado foi o íon monocarregado de m/z 588,8692 do ácido fosfórico. A massa MS/MS exata foi obtida automaticamente usando o Q-Tof's LockSpray™ (Waters, Miliford, MA, USA).

3.15 Eletroforese Bidimensional

3.15.1 Primeira dimensão- Isoeletrofocalização (IEF)

A isoeletrofocalização das proteínas foi realizada em equipamento Protean® IEF Cell (Bio-rad®) e conduzida em tiras IPG. A faixa de pH utilizada foi pH 3 – 10 linear em tiras de 7 cm. Previamente à isoeletrofocalização, as amostras contendo 100 μg de proteína total foram secas em um concentrador e ressuspensas em 125 μL de solução de re-hidratação (uréia 8M, CHAPS 2%, anfólitos 0,2%, DTT 50 mM e azul de bromofenol 0,001%) (Bio-rad®). Somente as amostras do plasma da hemolinfa dos grupos tratados pelo método de inoculação foram analisadas pela eletroforese bidimensional.

As amostras foram aplicadas no suporte e em seguida a fita protetora das tiras foi removida. As tiras foram posicionadas na cuba de IEF com o gel voltado para baixo.

Posteriormente, as tiras foram cobertas com 1 mL de óleo mineral (Bio-rad®) e a re-hidratação realizada a 20°C durante 12 horas. A IEF foi iniciada logo após o término da re-hidratação, de acordo com as etapas descritas na tabela 3.

Tabela 3. Protocolo de isoeletrofocalização no Protean® IEF Cell (Bio-rad®) para tiras IPG 7 cm*.

Intervalo de pH	Etapas (E)	Voltagem (V)	Tempo (h:min.)
3-10	Re-hidratação	50 V	12 h
	E1	200 V	1 h
	E2	500 V	1 h
	E3	1000 V	1 h
	E4	3000 V	30 min
	E5	3500 – 14000 V	Indeterminado (até atingir a voltagem máxima)
	<i>Hold step</i>	200 V	Indeterminado (até que o equipamento seja desligado)

*Baseado na recomendação da Bio-rad®.

3.15.2 Segunda dimensão - SDS-PAGE

Após a IEF, as tiras foram retiradas da cuba de IEF, o excesso de óleo mineral removido e a etapa de equilíbrio iniciada. As tiras foram colocadas na placa de incubação com o gel voltado para cima e imediatamente foram imersas em 1,5 mL do tampão de equilíbrio I (Tabela 4) (Bio-rad®). A placa de incubação foi mantida sob agitação branda por 10 min. Em seguida, o excesso de tampão foi removido e as tiras incubadas em tampão de equilíbrio II (Tabela 5) (Bio-rad®) por 10 min, sob agitação branda. O excesso de tampão foi retirado e as tiras foram lavadas três vezes em tampão de corrida Tris-Glicina-SDS 1x (Tris 24,7 mM; Glicina 192 mM, pH 8,3).

Tabela 4. Solução tampão de equilíbrio I com SDS (Bio-rad®) para incubação das tiras IPG utilizadas na isoeletrofocalização de proteínas (primeira dimensão do 2D-PAGE).

Componentes	Quantidade
Uréia	6 M
SDS	2 %
Tris-HCl pH 8,8	0,375 M
Glicerol	20 %
DTT	130 mM

Tabela 5. Solução tampão de equilíbrio II com SDS (Bio-rad®) para incubação das tiras IPG utilizadas na isoeletrofocalização de proteínas (primeira dimensão do 2D-PAGE).

Componentes	Concentração
Uréia	6 M
SDS	2 %
Tris-HCl pH 8,8	0,375 M
Glicerol	20 %
Iodoacetamida	135 mM

A segunda dimensão foi conduzida na cuba Mini Protean II (Bio-rad®). Cada tira foi posicionada sobre um gel de separação (SDS-PAGE 15%, 10 cm x 8 cm), realizado de acordo com Laemmli (1970). O padrão de peso molecular (Bio-rad®) foi aplicado em uma tira de papel filtro, posicionada na extremidade esquerda do gel. O espaço vazio foi preenchido com 0,5% de agarose morna e após a solidificação, a corrida foi iniciada mantendo-se a voltagem constante (200 V). Terminada a corrida eletroforética, os géis foram corados com solução de Coomassie coloidal *overnight*. O gel foi descorado com água destilada à temperatura ambiente. A digitalização das imagens foi realizada em LabScan (versão 3, Amersham Biosciences®), Labscanner Software e o scanner utilizado foi Image Scanner (versão 2, Amersham Pharmacia Biotech®, UK).

3.16 Análise Proteômica (gel 2D)

3.16.1 Digestão com tripsina

Os spots escolhidos foram excisados do gel de SDS-PAGE e foram transferidos separadamente para microtubos. Para descorar os spots, foram realizadas 3 lavagens (30 min cada) com 400 µL de solução NH₄CO₃ 25mM pH 8,8 em 50% ACN. Os spots foram desidratados por 5 minutos com 200 µL de ACN 100% e secos em um liofilizador. Foram adicionados 30 µL de solução de re-hidratação e digestão contendo NH₄CO₃ 50 mM e 15 µg de tripsina (Promega®), por 20 horas a 37 °C.

Após a digestão por tripsina, os peptídeos foram extraídos do gel pela adição de 30 µL de solução contendo TFA 5% e ACN 50% por 30 min, com agitação, e foram analisados por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF).

3.17 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As amostras de plasma da hemolinfa foram filtradas em membrana com filtro de 100 kDa (H100KDa) (Amicon®) e o filtrado analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por SDS-PAGE 15%. A hemolinfa filtrada na membrana H100KDa foi filtrada em membrana com filtro de 10 kDa (H10KDa) (Amicon®), de acordo com as orientações do fabricante.

Amostras de hemolinfa oriundas das filtrações em membranas H100KDa e H10KDa foram aplicadas em uma coluna analítica C18 fase reversa (Shimadzu CLC-ODS (M), 100Å, 5mm, 4,6 × 250mm), previamente equilibrada com água e ACN 90%, acoplada a um sistema

de CLAE (Shimadzu modelo LC-10A). A eluição foi realizada em um gradiente linear de 0-90% de ACN durante 60 min em um fluxo de 0,6mL/min. O volume de amostra injetado no cromatógrafo variou de acordo com o grupo de tratamento.

Amostras da hemolinfa coleta 48 horas após o tratamento por imersão foram aplicadas na coluna de gelfiltração (Superose 6HR 10/300 GL, GE Healthcare®) previamente equilibrada em tampão fosfato pH 7,2 a um fluxo de 0,5 mL/min durante 60 minutos. O pico da gelfiltração com maior absorbância foi aplicado na coluna C18 conforme descrito acima. O efluente de ambas as colunas foram monitorados com as absorbâncias de 220 nm e 280 nm.

3.18 Atividade Antimicrobiana do Plasma da Hemolinfa

3.18.1 Teste de difusão em meio sólido – antibiograma

As bactérias *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Escherichia coli* (gram-negativa) foram cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Instituto de Veterinária, UFRRJ.

As bactérias foram cultivadas em caldo Infuso de Cérebro e Coração (BHI) e mantidas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h. As suspensões bacterianas contendo 10⁶ UFC de *S. aureus* ou *E. coli* foram semeadas homoganeamente com *swab* estéril em placas de Petri contendo meio de cultura ágar BHI.

Para realização do teste de difusão em meio sólido, discos de papel filtro estéreis, com 6 mm de diâmetro, foram colocados sobre o meio de cultura para que as amostras de plasma da hemolinfa pudessem ter sua atividade antimicrobiana avaliada. Cada placa continha três discos de papel filtro. Em cada disco foram inoculados 4 µL da amostra. Foram utilizadas duas placas para cada amostra. As placas foram incubadas a 37 °C para posterior visualização de formação do halo de inibição do crescimento bacteriano, adaptando-se do descrito por Hunt (1986). As observações foram realizadas com 24 h e 48 h após a semeadura das bactérias em meio de cultura.

Além das amostras do plasma de hemolinfa coletadas 24 h e 48 h após os tratamentos com os fungos, foram utilizadas amostras de hemolinfa coletadas 6 h após tratamento por imersão ou inoculação.

3.18.2 Teste de difusão em meio sólido - antifungograma

Para avaliação da inibição ou redução do crescimento fúngico, suspensões conidiais na concentração 1 x 10⁸ conídios mL⁻¹ de *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* ou *F. oxysporum* foram semeadas homoganeamente com *swab* estéril em placas de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido de cloranfenicol (0,05%). Discos de papel filtro estéreis (6 mm) foram previamente imersos em cloranfenicol (500 mg/L), autoclavados (120 °C por 20 min) e secos em forno Pasteur a 100 °C para posterior aplicação das amostras. Foram utilizados 4 µL da amostra por disco. Para cada amostra foram utilizadas duas placas de Petri, onde cada placa continha três discos; logo foram realizadas 6 repetições por amostra. As placas de Petri foram incubadas a 25 ± 1 °C e UR ≥ 80% e as observações realizadas 24 h, 48 h e 72 h após realização do bioensaio para verificar a formação de halo ou zona de inibição ou redução fúngica, adaptando-se do descrito por Hunt 1986.

A atividade antifúngica das amostras de hemolinfa foi testada com o respectivo fungo utilizado no tratamento das fêmeas ingurgitadas, ou seja, a amostra de hemolinfa coletada de fêmeas ingurgitadas infectadas com *M. anisopliae* s.l. foi testada apenas contra *M. anisopliae* s.l. O mesmo foi realizado para os fungos *B. bassiana* e *F. oxysporum*. As amostras de hemolinfa dos grupos controle positivo e negativo foram testadas contra os três fungos.

As amostras de plasma da hemolinfa que exibiram atividade antimicrobiana foram analisadas por CLAE utilizando a coluna Superose, como descrito no item 3.13. As frações coletadas desta gelfiltração foram aplicadas na C18, utilizando a metodologia descrita no item 3.13. Posteriormente, as frações coletadas da coluna C18 foram completamente secas em evaporador, resuspensas em 100 µL de água para CLAE e monitoradas quanto à atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana destas frações foi testada contra o fungo utilizado no tratamento das fêmeas ingurgitadas e contra o fungo leveduriforme *Candida albicans*, conforme metodologia descrita acima.

A cepa de *C. albicans*, cedida pelo Laboratório de Micologia da UFRRJ, foi cultivada em caldo BHI e a quantificação da suspensão realizada em câmara de Neubauer, segundo Alves (1998). A suspensão contendo 1×10^7 células/mL foi espalhada homogeneamente com *swab* estéril em placas de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido de 1% de extrato de levedura. A avaliação da formação de halo de inibição foi realizada 24 h, 48 h e 72 h após a semeadura do fungo no meio de cultura.

3.19 Análise Proteômica das Frações com Atividade Antimicrobiana

3.19.1 Espectrometria de massas - MALDI-TOF

As frações coletadas da coluna C18 que apresentaram atividade antimicrobiana foram completamente secas em evaporador e resuspensas em 10 µL de TFA 0,1%. Em seguida, 1 µL da amostra foi adicionado a 1 µL de solução saturada (matriz) de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico em ACN 50%/TFA 0,3%. O volume de 1 µL desta mistura foi aplicado diretamente na placa do Maldi, mantida em temperatura ambiente para secar e em seguida analisada no espectrômetro. As amostras foram analisadas manualmente nos modos linear (1.000 a 20.000 Da) e refletido (900 a 5000 Da) (voltagem 20 kV, 1000 tiros por espectro). A calibração externa foi realizada com uma mistura de peptídeos Sequazyme Standard kit (Applied Biosystems®).

3.20 Busca no Banco de Dados

Os dados obtidos pela análise do MALDI-TOF foram processados no programa Data Explorer (versão 4.4, Applied Biosystems®) e os dados provenientes do ESI-Q-TOF foram processados no programa ProteinLynx Global Server (versão 2.0, Waters®) com auxílio do programa online MASCOT (www.matrixscience.com). Uma tolerância inicial de $\pm 0,1$ Da para foi empregada na análise do ESI-Q-TOF. As cisteínas foram consideradas carbamido-metiladas, além da oxidação por metionina.

3.21 Extração de Lipídeos

A extração dos lipídeos associados à hemolinfa e aos hemócitos foi realizada com clorofórmio: metanol: água (1: 2: 0,8) (v/v) de acordo com o método descrito por Bligh e Dyer (1959). Para tal extração, o volume de hemolinfa e hemócitos de cada amostra correspondente a 300 µg de proteína total foi colocado em um tubo de extração e adicionado água destilada até completar o volume de 800 µL. Em seguida, foi adicionado 2 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio. Os tubos foram agitados em vortex, de cinco em cinco minutos, durante 1 h. Após esse período, os tubos foram centrifugados 3000 rpm por 10 min (centrífuga clínica). O sobrenadante foi transferido para outro tubo de extração, no qual foi adicionado 1 mL de água e 1 mL de clorofórmio. Os tubos foram novamente centrifugados (3000 rpm/10 min) e a fase orgânica (parte inferior do tubo) retirada com o auxílio de uma

pipeta Pasteur e transferida para outro tubo de extração. A fase orgânica foi seca por arraste de Nitrogênio e armazenada a -20°C para posterior análise.

A extração dos lipídeos do corpo gorduroso foi realizada de acordo com a metodologia descrita acima, porém todo o infranatante resultante da homogeneização dos 10 corpos gordurosos foi utilizado para extração. A densitometria dos lipídeos foi normalizada em função da quantidade de proteína total contida no volume utilizado para extração de cada amostra.

3.21 Análises dos Lipídeos

Os lipídeos extraídos das amostras do plasma da hemolinfa e do corpo gorduroso foram analisados por cromatografia em camada delgada unidimensional em placas de sílica gel (Merck®) enquanto que os lipídeos das amostras de hemócitos foram analisados por cromatografia em camada delgada de alta performance (Merck®). Os lipídeos foram reconstituídos em 30 µL de clorofórmio para aplicação das amostras nas placas de sílica. Os fosfolipídeos foram separados utilizando uma mistura de solventes: acetona: metanol: ácido acético: clorofórmio: água (15:13:12:40:8, v/v) (HORWITZ; PERLMAN, 1987) enquanto os lipídeos neutros foram separados após a corrida das placas de sílica gel em mistura de hexano: éter etílico: ácido acético (60:40:1, v/v) (KAWOOWA; LAW, 1988). Após a evaporação dos solventes, as placas de cromatografia foram pulverizadas com a solução de Cherring constituída de sulfato de cobre 10% (p/v) e ácido fosfórico 8% (v/v) e queimadas em forno Pasteur a 170°C por 5-10 min (RUIZ; OCHOA, 1997). As imagens foram submetidas à densitometria através do programa Image Master Total Lab versão 1.11 (GE Healthcare® - Brazil Life Sciences, São Paulo, SP, Brazil).

3.22 Determinação da Atividade Lipase no Corpo Gorduroso

3.22.1 Preparo da enzima (lipase)

Os corpos gordurosos foram homogeneizados em tampão fosfato pH 7,2 utilizando-se um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem com um pestilo de Teflon. O homogenato foi centrifugado a 5040 × g por 20 min e o infranatante submetido às análises. Foi realizada dosagem de proteínas, utilizando-se o método de Lowry modificado (MARKWELL et al., 1978) e em seguida a determinação da atividade lipase.

3.22.2 Determinação da atividade lipase

A atividade lipase no corpo gorduroso das fêmeas ingurgitadas inoculadas com os fungos foi determinada utilizando a metodologia descrita por Choi et al. (2003). Foram preparadas soluções estoques de ácido 5,5 ditiobis (2-nitro-benzóico) (DTNB) 40 mM em isobutanol e 2,3-dimercapto-1-propanol tributirato (DMPTB) 10 mM em Triton X-100. A mistura de reação contendo DMPTB 0,2 mM, DTNB 0,8 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 10% e Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 foi misturada sob agitação por 1 minuto em um volume final de 900 µL. Foram transferidos 180 µL da mistura de reação para poços de microplacas e em seguida, adicionados 20 µL da preparação de enzima. A microplaca foi imediatamente incubada a 37°C durante 15 min e a atividade determinada em leitor de ELISA (modelo BIORAD iMARK™) a 405 nm. A leitura da absorbância de cada amostra foi realizada em

triplicata e todo o ensaio realizado duas vezes, em momentos distintos, ou seja, outras fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e novas suspensões fúngicas.

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade dos Conídios

Os conídios das suspensões de *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* e *F. oxysporum* utilizadas nos bioensaios apresentaram 100% de germinação após 24 h de incubação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$.

4.2 Reisolamento dos Fungos após Bioensaios

Amostras de fêmeas ingurgitadas dos grupos tratados com suspensões conidiais de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* incubadas em câmara úmida apresentaram desenvolvimento de colônias fúngicas em ambos os tratamentos (imersão ou inoculação).

No quarto dia após o tratamento por imersão, a ação de ambos os fungos entomopatogênicos foi observada, uma vez que as fêmeas já apresentavam redução do seu tamanho e da postura quando comparado com o grupo controle (Figuras 3B, 3C e 3A, respectivamente), porém não foi observado o crescimento de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* sobre a cutícula das fêmeas.

No oitavo dia após o tratamento por imersão, as fêmeas tratadas com *M. anisopliae* s.l. já estavam mortas e seus cadáveres já apresentavam alteração na coloração da cutícula e completa redução de tamanho (Figura 3F) quando comparado com o grupo controle, porém não foi observada a esporulação do fungo sobre a cutícula. O crescimento fúngico sobre a cutícula das fêmeas somente foi observado no grupo tratado com *B. bassiana* (Figura 3G). As fêmeas dos grupos controle e tratadas com *F. oxysporum* não apresentaram crescimento de fungos e estavam fazendo postura (Figuras 3A e 3D).

Em relação ao tratamento por inoculação, no quarto dia já se pôde observar o crescimento de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* sobre a cutícula das fêmeas (Figura 4C e 4D); o grupo de fêmeas inoculadas com *F. oxysporum* não apresentou desenvolvimento de colônia fúngica sobre a cutícula, embora todas as fêmeas já estivessem com coloração escurecida e moribundas (Figura 4E). No oitavo dia após inoculação, as fêmeas apresentavam completo desenvolvimento de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* sobre toda a superfície da cutícula (Figura 4H e 4I). Tais colônias foram avaliadas quanto as suas características macro e micromorfológicas e identificadas como sendo as mesmas espécies de fungos utilizadas no bioensaio.

Amostras de fêmeas ingurgitadas dos grupos controles (PICADO ou inoculado com água destilada estéril e Tween 80 0,1%) e inoculados com *F. oxysporum* não apresentaram desenvolvimento de colônias fúngicas (Figuras 4A, 4B, 4E, 4F, 4G, 4J).

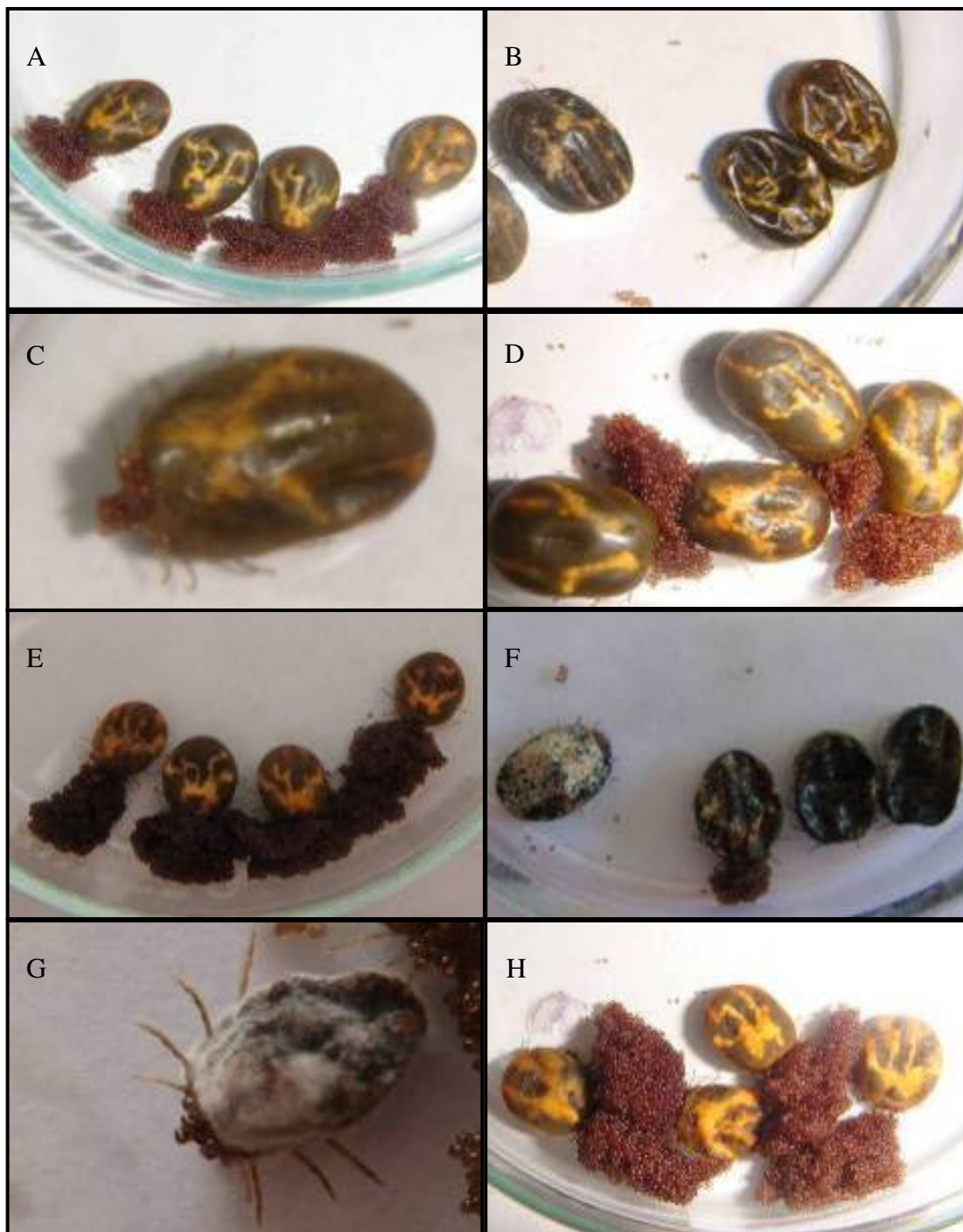


Figura 3. Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após o tratamento por imersão. A-D: quarto dia após o tratamento. A: grupo controle; B: grupo tratado com *Metarhizium anisopliae* s.l.; C: grupo tratado com *Beauveria bassiana*; D: grupo tratado com *Fusarium oxysporum*. E-H: oitavo dia após o tratamento. E: grupo controle; F: grupo tratado com *Metarhizium anisopliae* s.l.; G: grupo tratado com *Beauveria bassiana*; H: grupo tratado com *Fusarium oxysporum*.

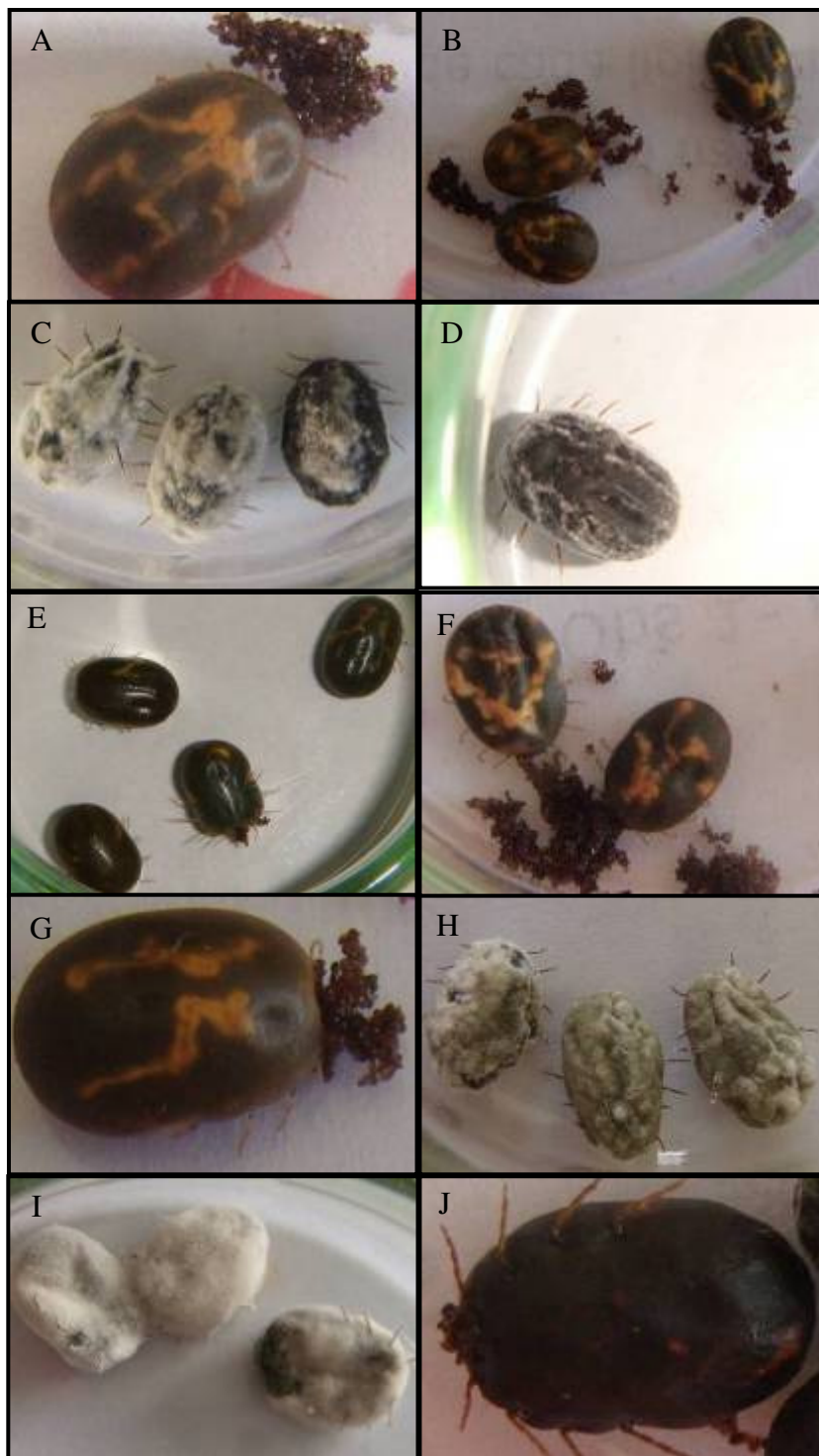


Figura 4. Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após o tratamento por inoculação A-E: quarto dia após o tratamento. A: grupo picado; B: grupo inoculado com água destilada estéril e Tween 80 0,1%; C: grupo inoculado com *Metarhizium anisopliae* s.l.; D: grupo inoculado com *Beauveria bassiana*; E: grupo inoculado com *Fusarium oxysporum*. F-J: oitavo dia após o tratamento. F: grupo picado; G: grupo inoculado com água destilada estéril e Tween 80 0,1%; H: grupo inoculado com *Metarhizium anisopliae* s.l.; I: grupo inoculado com *Beauveria bassiana*; J: grupo inoculado com *Fusarium oxysporum*.

4.3 Coleta da Hemolinfa

A coleta da hemolinfa foi bem sucedida em todos os grupos (Figura 5), com exceção do Fo INO 48 e Ma INO 48. As fêmeas inoculadas com *M. anisopliae* s.l. (Figura 6C) e *F. oxysporum* (Figura 6E) mostram-se mais intumescidas que as fêmeas dos grupos controle ou inoculadas com *B. bassiana* (Figuras 6A, 6B e 6D, respectivamente). Logo, alguns dados relacionados a estes grupos não foram obtidos em função da impossibilidade da coleta de hemolinfa gerada pela destruição dos tecidos das fêmeas de *R. microplus* (Figura 7) e conseqüente alteração das características desta hemolinfa, como coloração e composição.

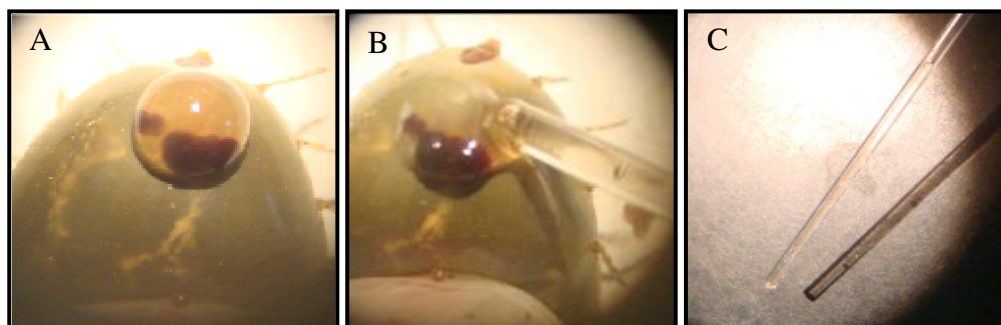


Figura 5. Etapas da coleta de hemolinfa. A: saída da hemolinfa após perfuração da cutícula com agulha ultrafina; B: coleta da hemolinfa com auxílio de capilar de vidro. C: hemolinfa no interior do capilar de vidro.



Figura 6. Comparação de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos diferentes grupos utilizados para coleta de hemolinfa 48 horas após o tratamento por inoculação. A: controle; B: controle inoculado com água destilada estéril e Tween 80 0,1%; C: inoculado com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l.; D: *Beauveria bassiana*; E: *Fusarium oxysporum*. As fêmeas representadas nas figuras C e E mostram-se intumescidas.

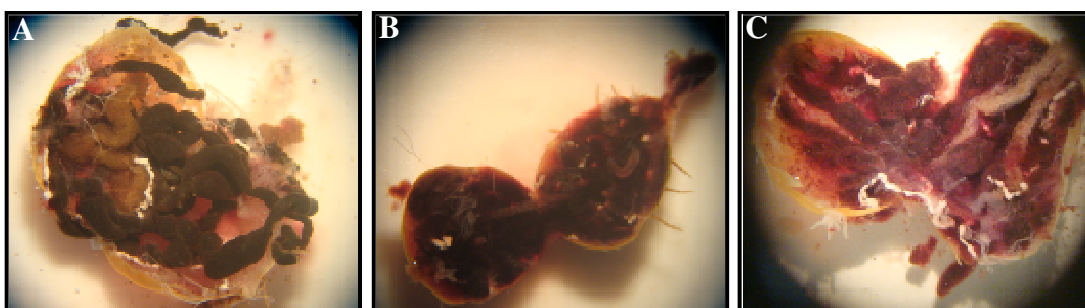


Figura 7. Comparação dos tecidos internos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* 48 horas após o tratamento por inoculação. A: controle inoculado com água destilada estéril e Tween 80 0,1%; B: inoculação com *Metarhizium anisopliae* s.l.; C: *Fusarium oxysporum*. Dissecção realizada com 48 horas após a inoculação.

4.4 Dosagem de Proteínas

A concentração de proteína total no plasma da hemolinfa mostrou-se significativamente diferente entre os grupos tratados por imersão (Figura 8) ou inoculação (Figura 9) com os fungos *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* ou *F. oxysporum*. Na coleta realizada 24 h após o tratamento por imersão, a concentração de proteína total do grupo Fo IME 24 ($108,2 \pm 10,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado com o grupo CTR 24 ($112,3 \pm 7,3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). O grupo do fungo entomopatogênico Ma IME 24 ($78,9 \pm 10,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) reduziu significativamente a concentração de proteína total quando comparados com CTR 24 ($p < 0,05$); no entanto, o outro entomopatógeno *B. bassiana* (Bb IME 24 ($122,7 \pm 12,9 \mu\text{g}/\mu\text{L}$)) aumentou significativamente a concentração de proteína total no plasma da hemolinfa quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$).

Na coleta realizada 48 h após o tratamento por imersão, não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) entre o grupo CTR 48 ($110,6 \pm 10,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e os grupos Bb IME 48 ($97,9 \pm 8,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e Fo IME 48 ($123,0 \pm 15,0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). O grupo Ma IME 48 ($64,5 \pm 5,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) reduziu significativamente a concentração de proteína total quando comparado com os grupos CTR 48 ($p < 0,01$), Fo IME 48 ($p < 0,01$) e Bb IME 48 ($p < 0,05$).

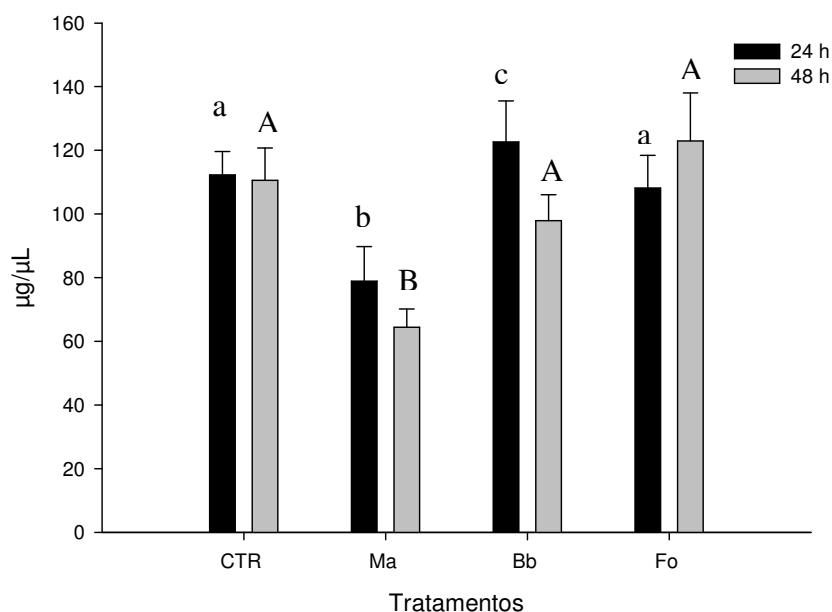


Figura 8. Concentração de proteína total do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão em suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Cada grupo continha 90 fêmeas.

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de SNK.

Em relação ao tratamento por inoculação, não houve diferença significativa ($p>0,05$) na concentração de proteína total entre os grupos PICADO 24 ($124,5 \pm 7,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e H2O 24 ($127,6 \pm 5,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). As concentrações obtidas nos grupos inoculados com os fungos, Fo INO 24 ($57,0 \pm 5,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), Bb INO 24 ($65,0 \pm 21,3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e Ma INO 24 ($87,5 \pm 13,7 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram significativamente diferentes dos grupos controles H2O 24 e PICADO 24, porém não demonstraram diferença significativa ($p>0,05$) quando comparados entre si.

A concentração de proteína total 48 h após o tratamento por inoculação dos grupos PICADO 48 ($117,0 \pm 11,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), H2O 48 ($134,4 \pm 12,7 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), Ma INO 48 ($85,8 \pm 28,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e Bb INO 48 ($77,9 \pm 15,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) não apresentou diferença significativa ($p>0,05$). A dosagem de proteína total do grupo Fo INO 48 foi de $121,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, porém este grupo não entrou na estatística devido a sua ausência em algumas coletas, como justificado no item 4.3.

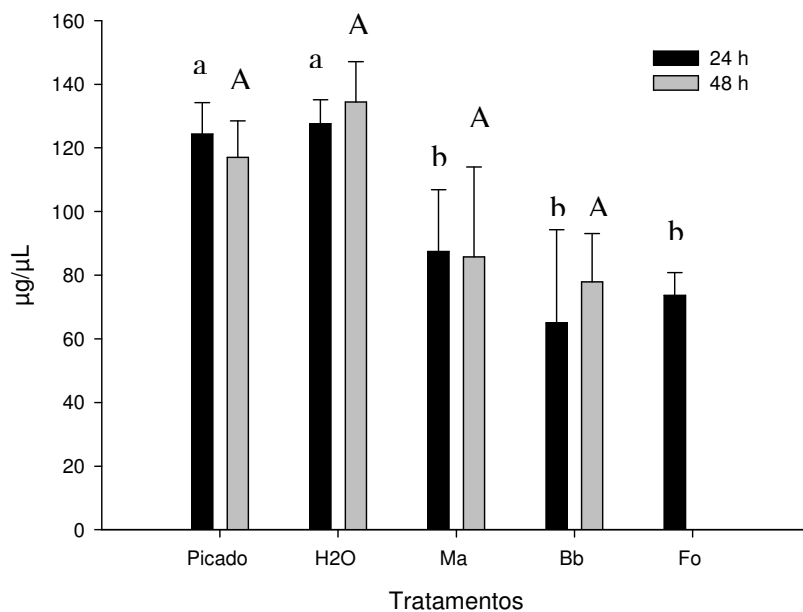


Figura 9. Concentração de proteína total do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por inoculação da suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Cada grupo continha 90 fêmeas.

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de SNK.

A concentração de proteína total dos hemócitos coletados após o tratamento por imersão está demonstrada na figura 10. O grupo Bb IME 24 ($32,5 \pm 1,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) reduziu significativamente ($p<0,05$) a concentração de proteína total quando comparado com o grupo CTR 24 ($42,0 \pm 1,0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$); no entanto, os grupos Ma IME 24 ($38,1 \pm 2,7 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e Fo IME 24 ($38,7 \pm 2,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) não demonstraram diferença significativa ($p>0,05$) quando comparados com o CTR 24. Quando o grupo Ma IME 24 foi comparado com os demais grupos de fungos (Bb IME 24 e Fo IME 24) não ocorreu diferença significativa ($p>0,05$).

Na coleta realizada 48 h após o tratamento por imersão, também não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos CTR 48 ($42,1 \pm 4,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e Ma IME 48 ($51,5 \pm 7,4$

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e entre CTR 48 e Fo IME 48. O grupo Ma IME 48 se mostrou diferente dos grupos Bb IME 48 ($18,4 \pm 2,4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) ($p < 0,001$) e Fo IME 48 ($31,9 \pm 2,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) ($p < 0,05$).

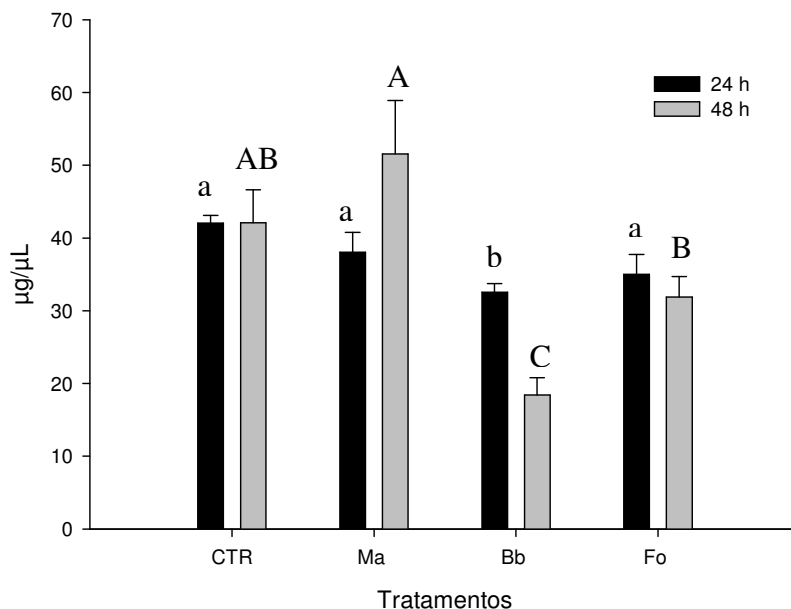


Figura 10. Concentração de proteína total dos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão em suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Cada grupo continha 90 fêmeas.

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de SNK.

No tratamento por inoculação (Figura 11), o grupo PICADO 24 ($51,5 \pm 1,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo H2O 24 ($44,8 \pm 1,3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). Ambos os grupos controles foram significativamente diferentes ($p < 0,001$) dos grupos inoculados com fungos Ma INO 24 ($9,7 \pm 1,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), Bb INO 24 ($13,8 \pm 4,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e Fo INO 24 ($11,5 \pm 0,7 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). Não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos inoculados com fungos. Já na coleta realizada 48 h após o tratamento, os grupos PICADO 48 ($22,5 \pm 2,4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e H2O 48 ($26,8 \pm 3,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si, e ambos foram significativamente diferentes ($p < 0,001$) dos grupos Ma INO 48 ($6,9 \pm 1,4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e Bb INO 48 ($5,1 \pm 0,9 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). Não ocorreu diferença significativa entre os grupos Ma INO 48 e Bb INO 48.

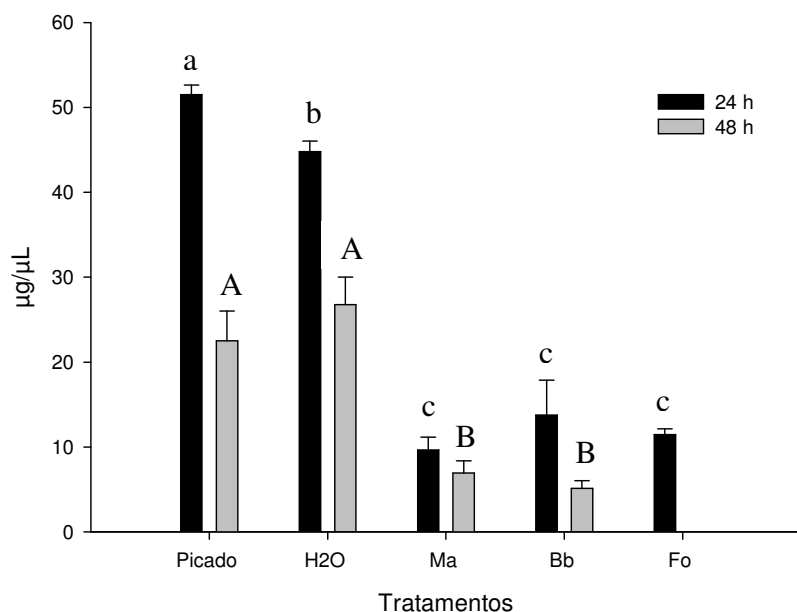


Figura 11. Concentração de proteína total dos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por inoculação da suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Cada grupo continha 90 fêmeas.

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de SNK.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na concentração de proteína total dos corpos gordurosos das fêmeas ingurgitadas tratadas com os fungos *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* e *F. oxysporum* quando comparados com os grupos controles, em ambos os tempos de coleta (Figura 12).

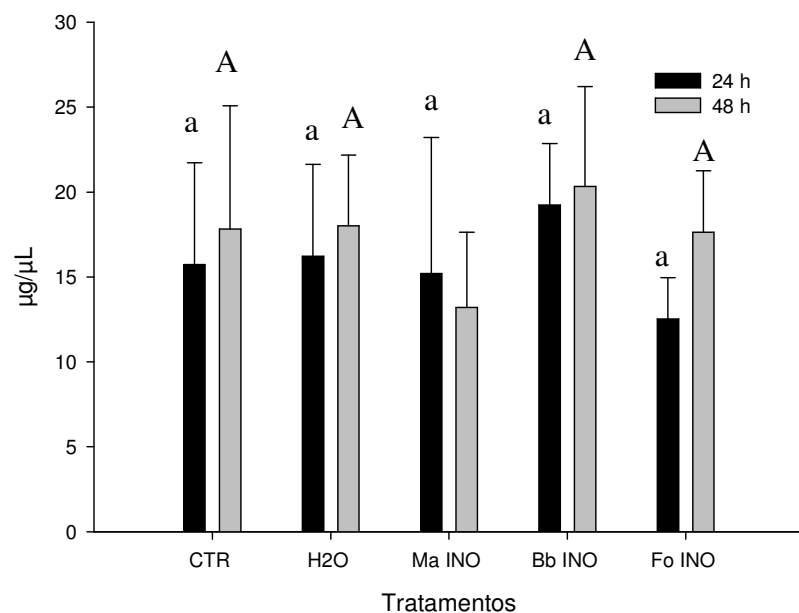


Figura 12. Concentração de proteína total do corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por inoculação da suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Cada grupo continha 90 fêmeas.

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de SNK.

4.5 Quantificação de hemócitos

A quantidade de hemócitos obtida na coleta da hemolinfa dos grupos tratados por imersão ou inoculação está representada nas figuras 13 e 14, respectivamente. No tratamento por imersão, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos, independente do tempo de coleta.

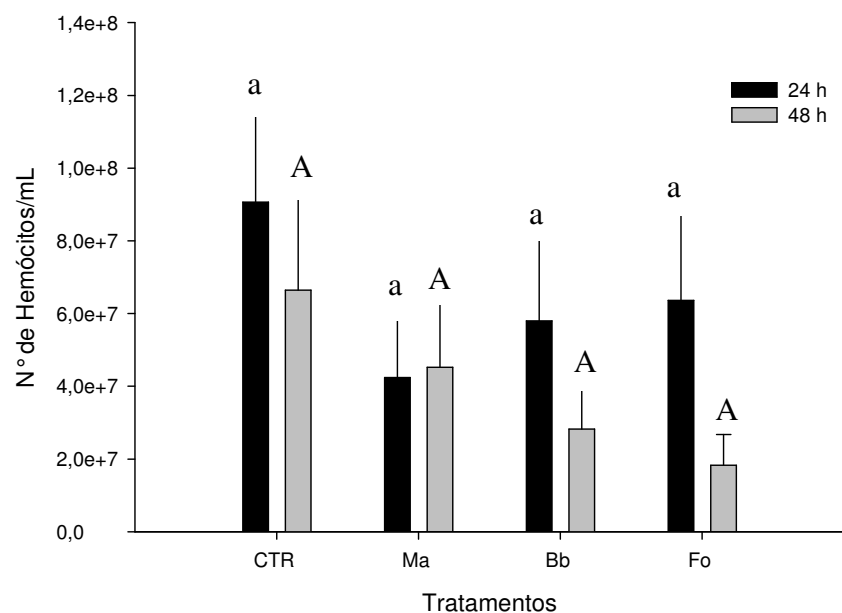


Figura 13. Quantificação dos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão em suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Cada grupo continha 90 fêmeas.

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de SNK.

No tratamento por inoculação também não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos PICADO 24 ($2,71E+08 \pm 1,00E+08$ hemócitos/ μ L) e H2O 24 ($2,35E+08 \pm 6,31E+07$ hemócitos/ μ L) e entre os grupos tratados com fungos Ma INO 24 ($4,86E+07 \pm 1,22E+07$ hemócitos/ μ L), Bb INO 24 ($5,15E+07 \pm 1,17E+07$ hemócitos/ μ L) e Fo INO 24 ($4,52E+07 \pm 1,25E+07$ hemócitos/ μ L), porém houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com os fungos e os controles.

Na coleta realizada 48 h após o tratamento por inoculação, os grupos controles apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si. A quantidade de hemócitos dos grupos Ma INO 48 ($2,33E+07 \pm 1,39E+07$ hemócitos/ μ L) e Bb INO 48 ($2,92E+07 \pm 3,09E+07$ hemócitos/ μ L) foi significativamente diferente dos grupos PICADO 48 ($1,32E+08 \pm 1,70E+07$ hemócitos/ μ L) ($p < 0,05$) e H2O 48 ($4,41E+08 \pm 7,74E+07$ hemócitos/ μ L) ($p < 0,01$).

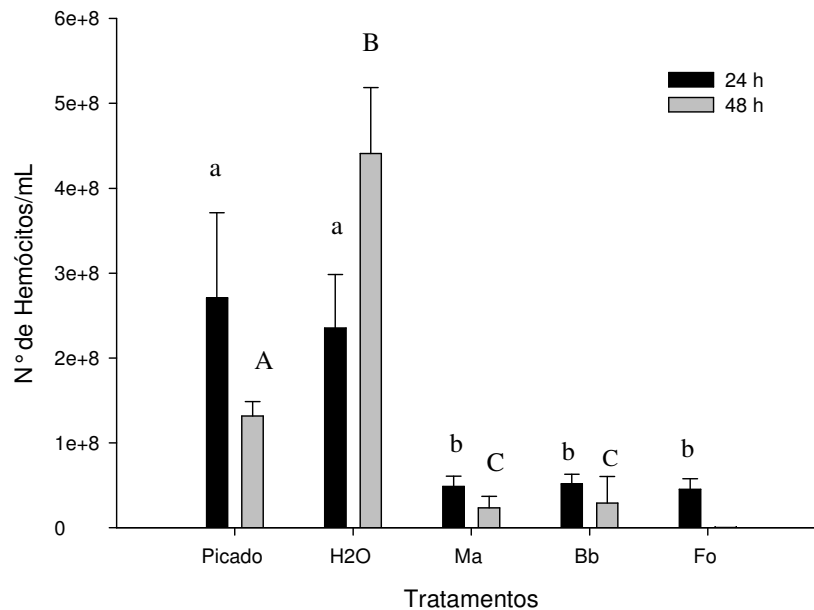


Figura 14. Quantificação dos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por inoculação da suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Cada grupo continha 90 fêmeas.

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de SNK.

4.6 Eletroforese Unidimensional (SDS-PAGE)

No SDS-PAGE 10%, o perfil protéico do plasma da hemolinfa dos grupos tratados com os fungos se manteve similar ao do grupo controle, ou seja, todas as proteínas/peptídeos presentes no grupo controle foram encontradas nos demais grupos (Figura 15). Porém houve variação na intensidade da proteína com peso entre 55 kDa e 37 kDa (indicada na figura 15) e da banda com peso molecular entre 6 kDa e 19 kDa (indicada na figura 15) nos grupos tratados com fungos. Amostras do plasma da hemolinfa dos grupos tratados somente com o fungo *M. anisopliae* s.l. foram re-analisadas através de SDS-PAGE 15%, onde a maior intensidade da banda entre 6 kDa e 19 kDa no grupo Ma INO 48 foi confirmada (Figura 16) bem como foi confirmada a variação na intensidade da proteína com peso entre 55 kDa e 37 kDa.

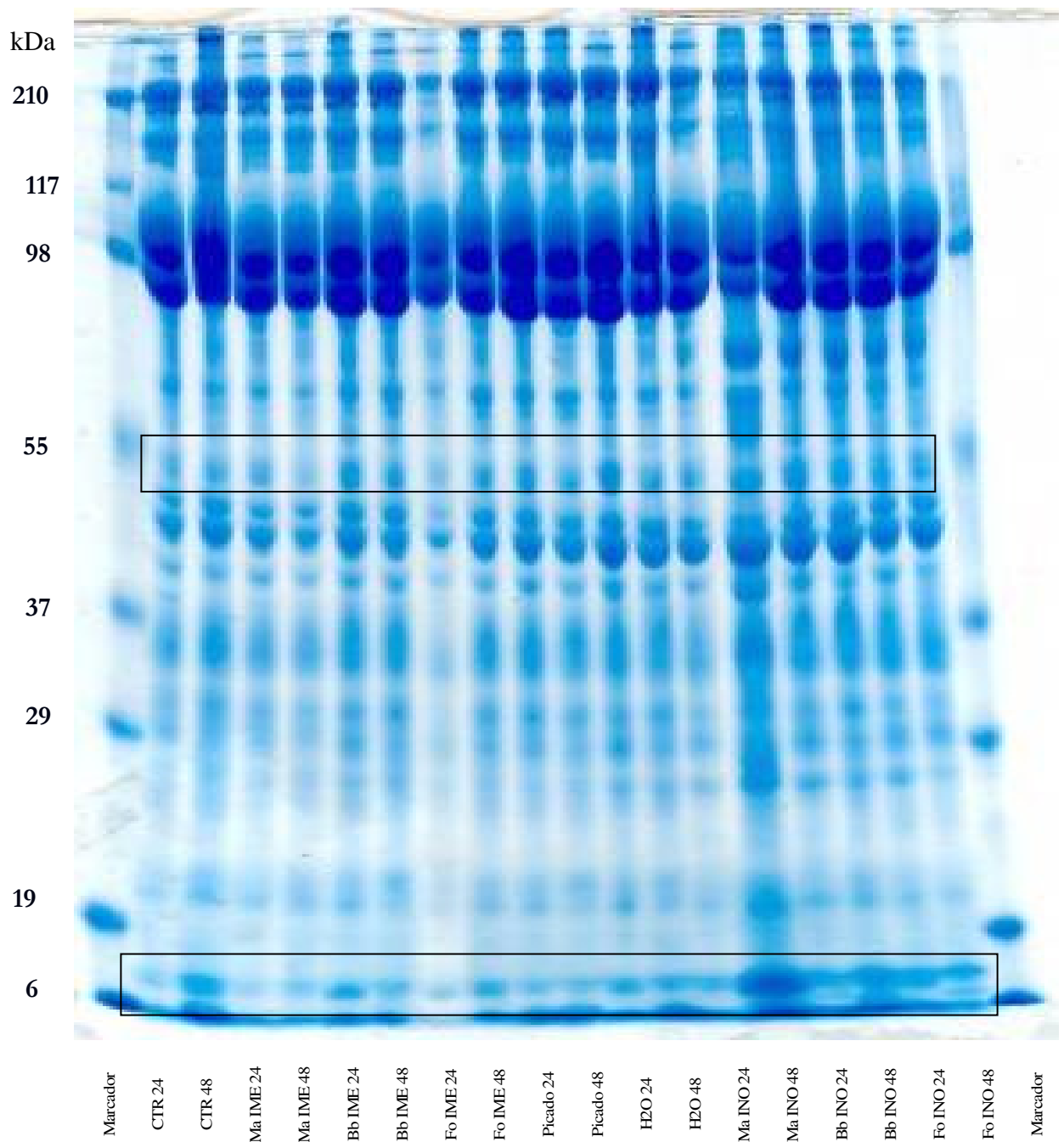


Figura 15. SDS-PAGE 10% do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Hemolinfa coletada 24 e 48 horas após tratamento por imersão ou inoculação com *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Em destaque, as alterações observadas na intensidade da expressão da proteína com peso molecular próximo a 55 kDa e do peptídeo com peso molecular próximo a 6 kDa. Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com Coomassie Coloidal.

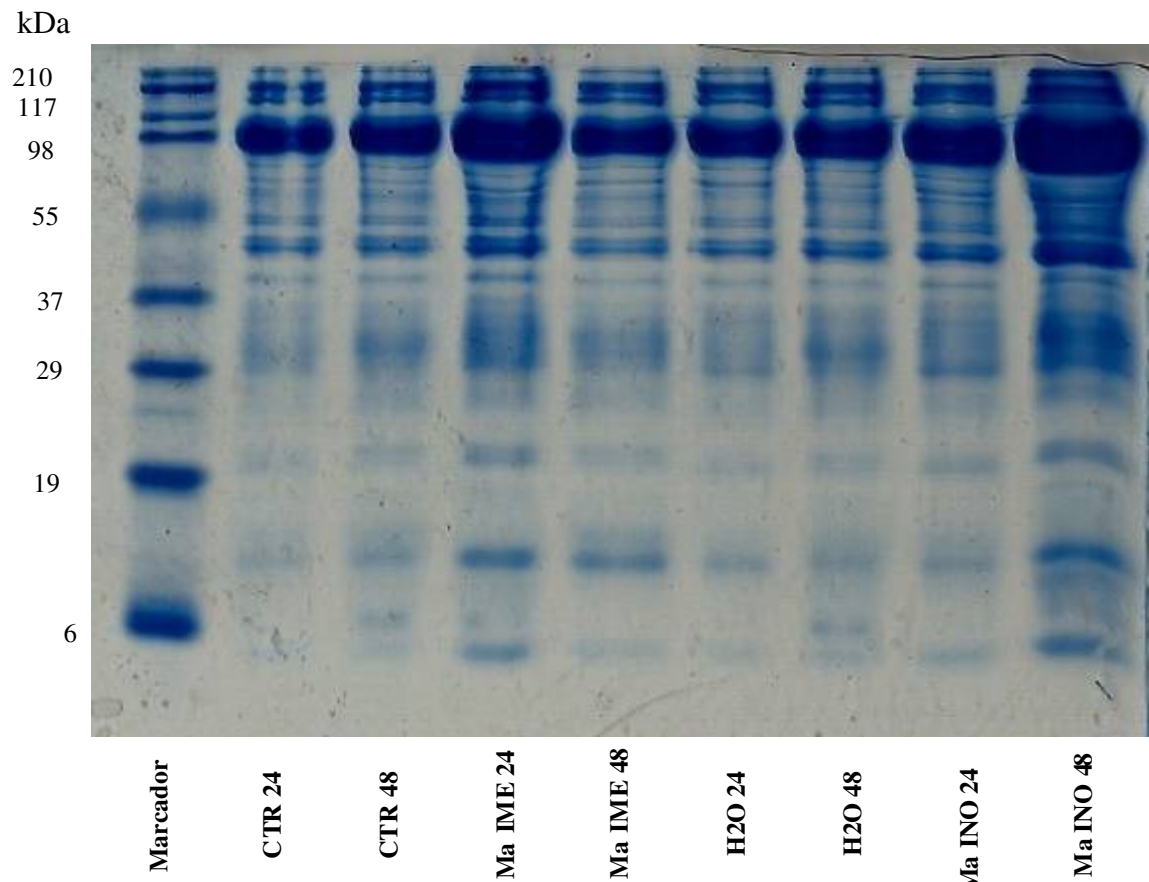
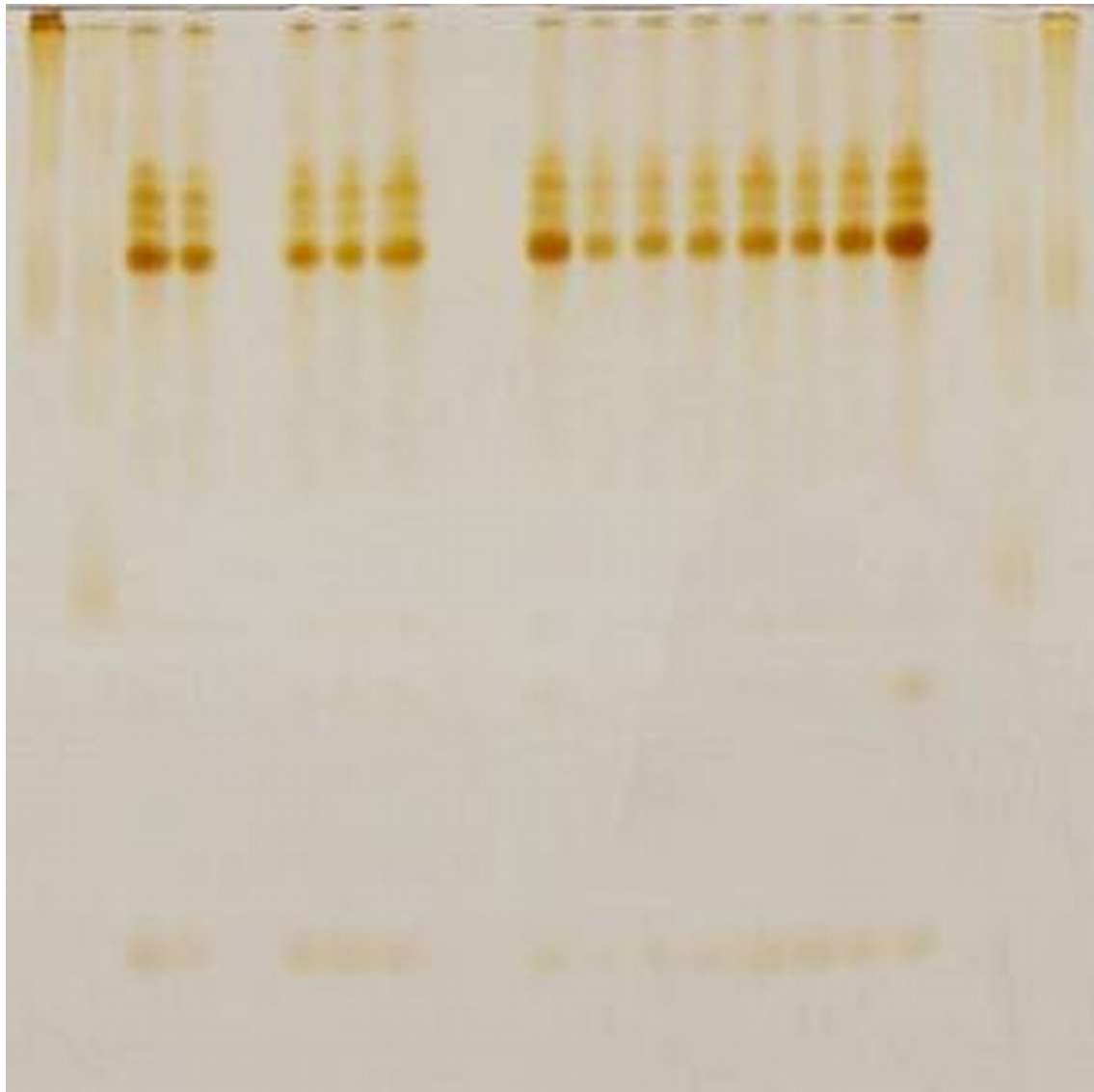


Figura 16. SDS-PAGE 15% de plasma da hemolinfa de *Rhipicephalus microplus* tratadas com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l. por imersão ou inoculação. Hemolinfa coletada 24 e 48 horas após o tratamento por imersão ou inoculação com *Metarhizium anisopliae* s.l. para confirmação das bandas com peso molecular de aproximadamente 6 kDa. Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com Coomassie Coloidal.

O perfil eletroforético das proteínas filtradas em membranas de 100 kDa também se manteve similar em todos os grupos, tanto no gel de eletroforese nativo (Figura 17) quanto no SDS-PAGE, realizado com diferentes concentrações de acrilamida (Figuras 18 e 19).

As proteínas dos grupos Bb IME 24 e Ma INO 24 não apareceram no gel, mesmo utilizando a coloração por nitrato de prata, que apresenta sensibilidade maior que a coloração com o Coomassie Blue. Provavelmente as proteínas de alto peso molecular destes grupos ficaram aderidas na membrana durante a filtração, ou seja, somente passaram pela membrana os peptídeos, que não foram corados no gel, já que o filtrado foi submetido a dosagem de proteína após a filtração e antes da confecção do gel. O perfil dos peptídeos filtrados em membranas de 10 kDa foram estudados somente por CLAE, utilizando a coluna analítica C18.



Marcador Alto
 Marcador Baixo
 Ma IME 24
 Bb IME 24
 Fo IME 24
 Picado 24
 H2O 24
 Ma INO 24
 Bb INO 24
 Fo INO 24
 CTR 48
 Ma IME 48
 Bb IME 48
 Fo IME 48
 Picado 48
 H2O 48
 Ma INO 48
 Bb INO 48
 Fo INO 48
 Marcador Alto
 Marcador Baixo

Figura 17. Gel nativo 15% de proteínas do plasma da hemolinfa menor que 100 kDa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Hemolinfa coletada 24 e 48 horas após tratamento por imersão ou inoculação com *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Coloração realizada com nitrato de prata.

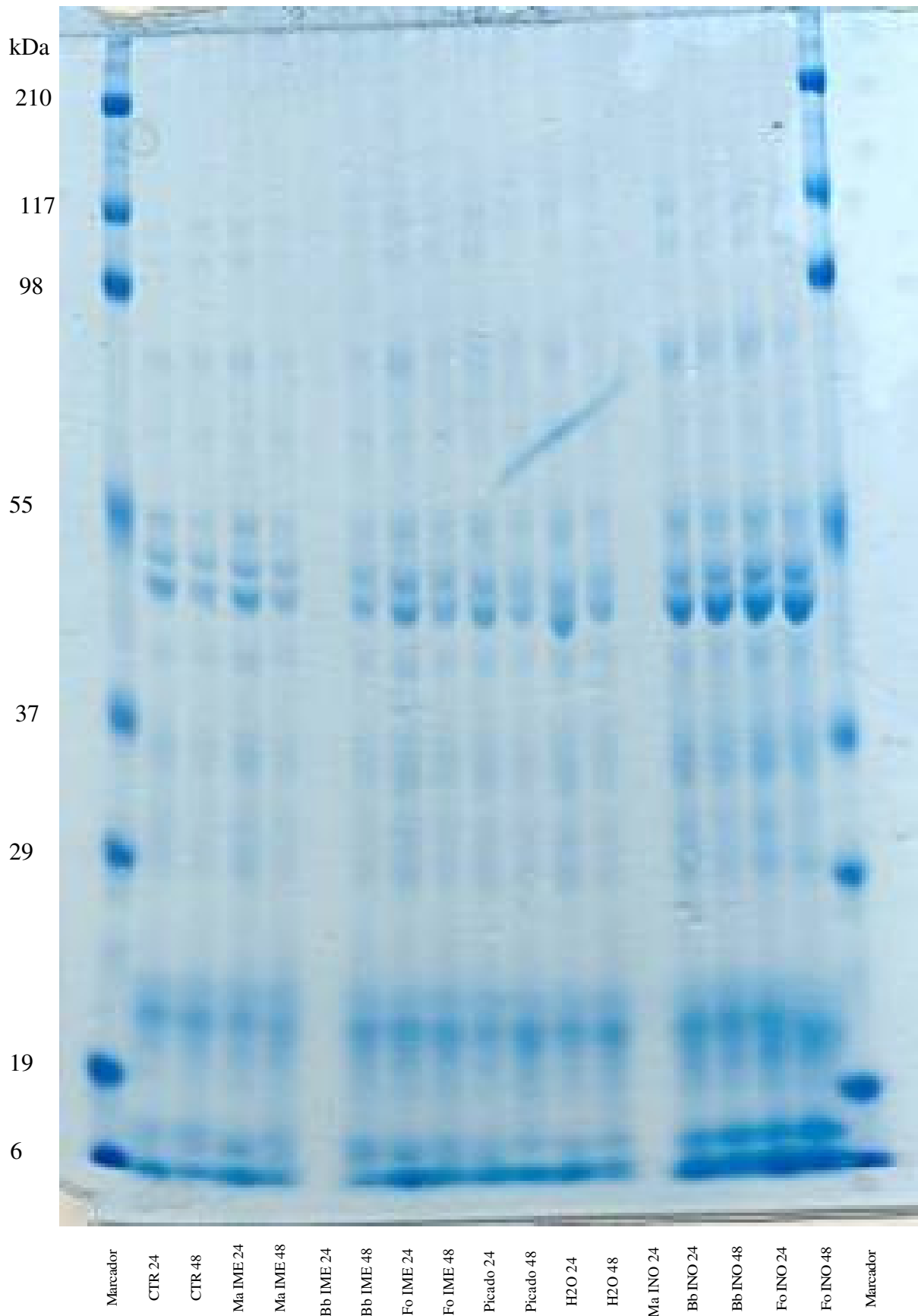


Figura 18. SDS-PAGE 10% de proteínas do plasma da hemolinfa menor que 100 kDa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Hemolinfa coletada 24 e 48 horas após tratamento por imersão ou inoculação com *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com Coomassie Brillhante Blue.

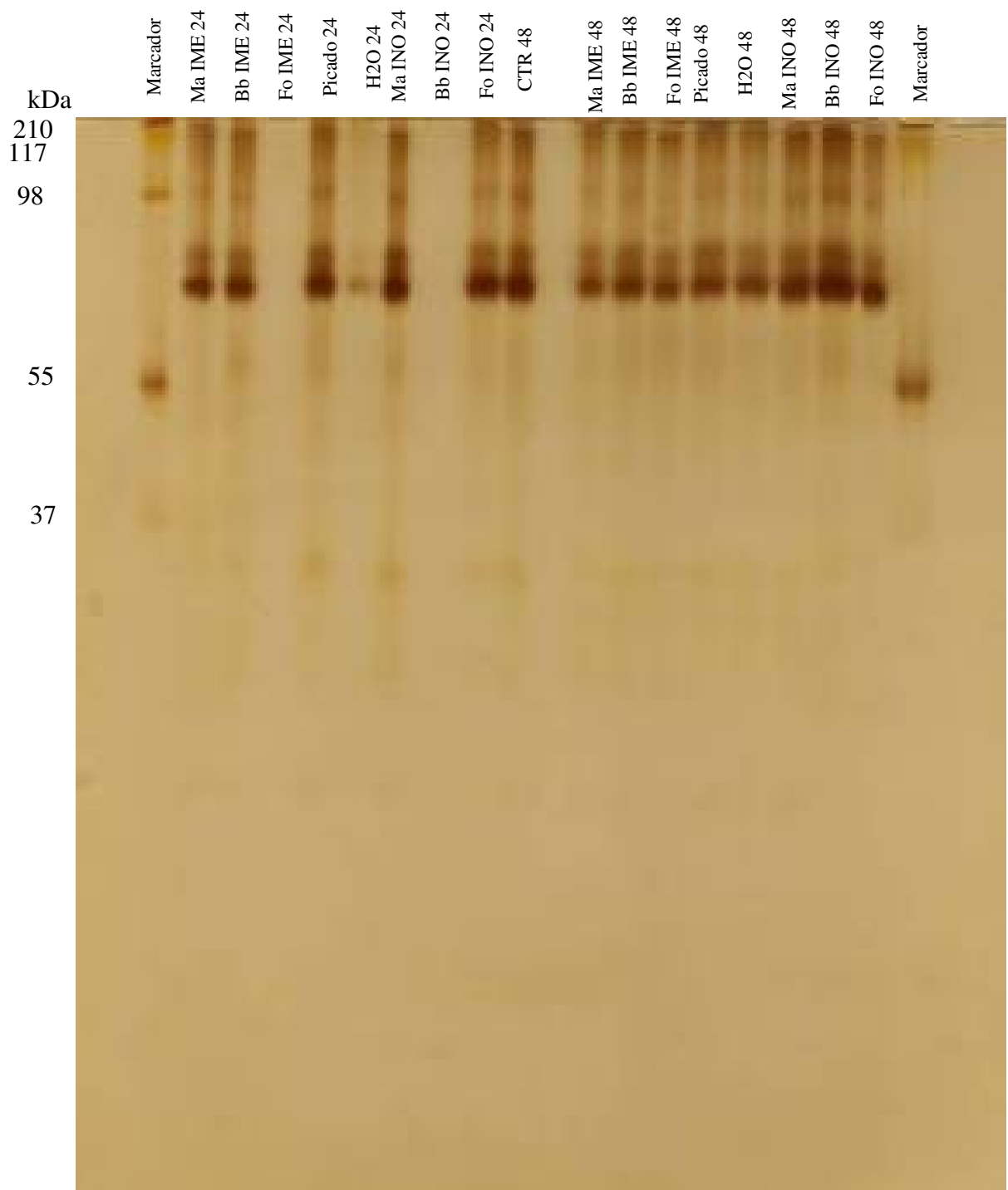


Figura 19. SDS-PAGE 15% de proteínas do plasma da hemolinfa menor que 100 kDa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Hemolinfa coletada 24 e 48 horas após tratamento por imersão ou inoculação com *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com nitrato de prata.

Os hemócitos também não demonstraram alteração no perfil protéico entre os grupos estudados (Figura 20). Porém as amostras que demonstraram alteração na sua expressão das proteínas foram re-analisadas e as bandas identificadas por MS/MS.

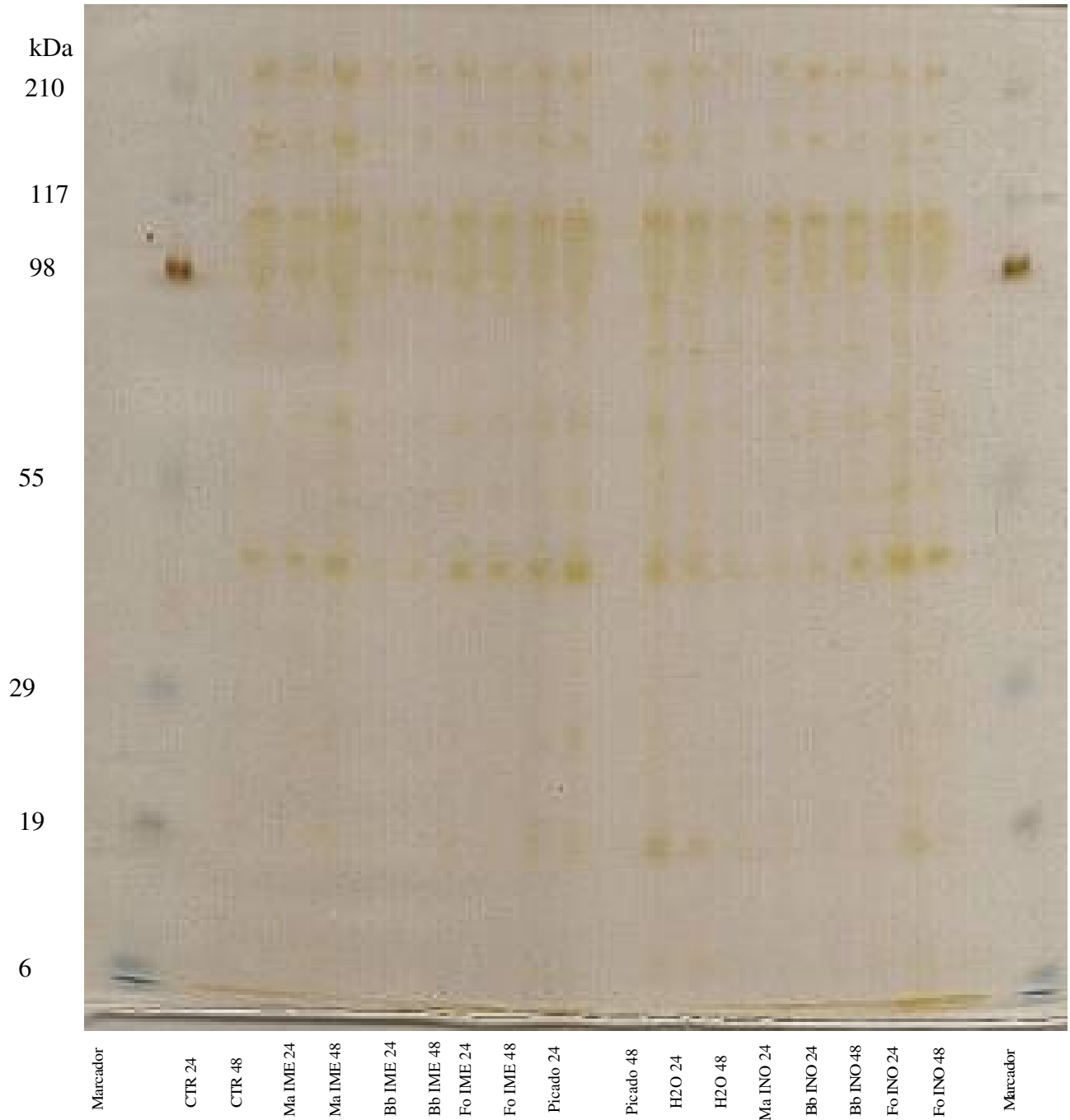


Figura 20. SDS-PAGE 12% de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletados 24 e 48 horas após tratamento por imersão ou inoculação com *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Padrão de peso molecular indicado a esquerda no gel. Coloração realizada com nitrato de prata.

O perfil eletroforético das proteínas contidas no corpo gorduroso foi similar entre os grupos controle e inoculados com os fungos (Figura 21A). As bandas das proteínas do grupo Ma INO 24 apareceram com menor intensidade provavelmente em função de algum erro na aplicação, uma vez que um novo gel foi realizado e as bandas foram mais expressivas, porém o perfil de proteínas foi semelhante aos dos demais grupos (Figura 21B).

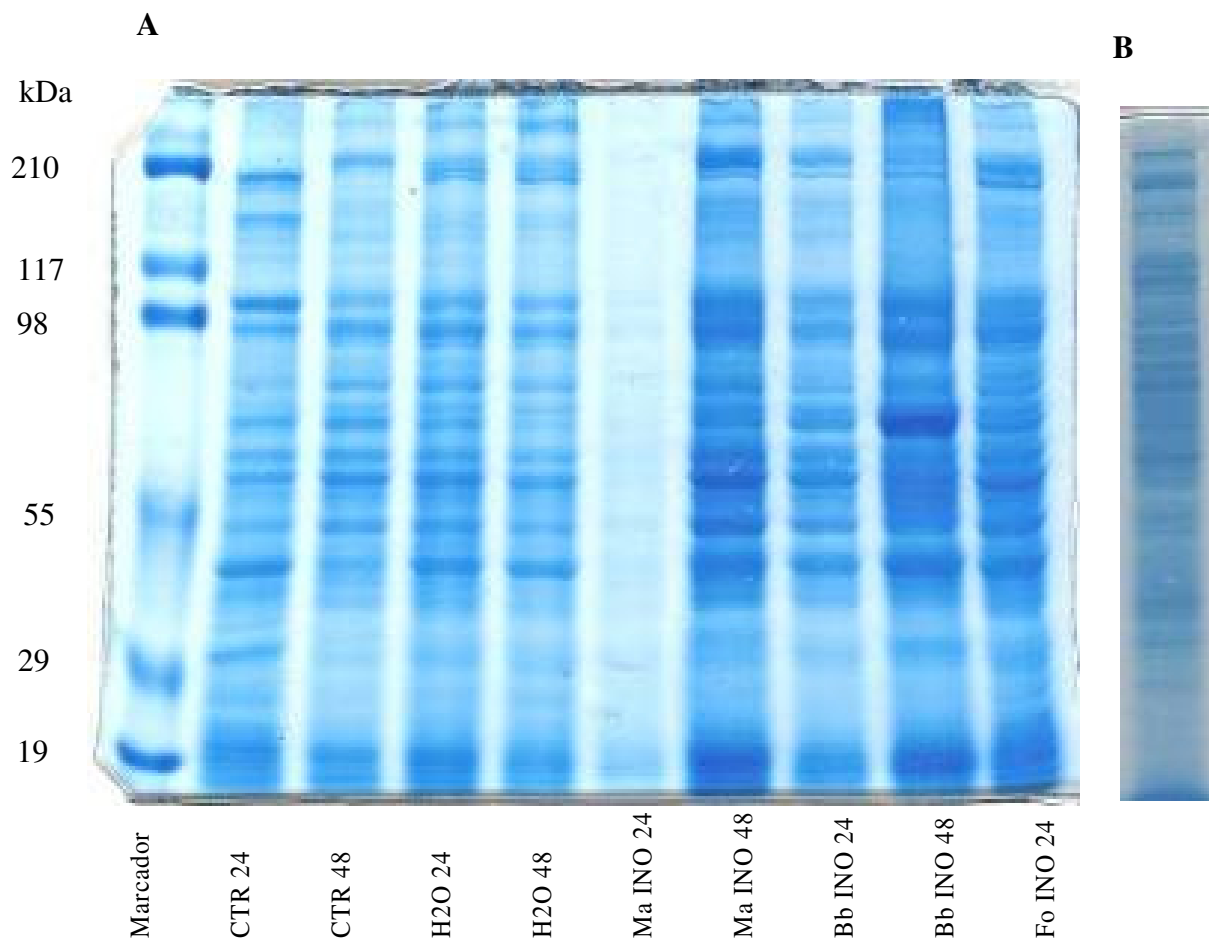


Figura 21. SDS-PAGE 10%. A: perfil eletroforético das proteínas do corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. B: repetição do grupo Ma INO 24 (SDS-PAGE 10%) para confirmação das proteínas presentes na amostra. Dissecção dos corpos gordurosos realizada com 24 e 48 horas após o tratamento. Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com Coomassie Coloidal.

4.7 Análise proteômica – gel 1D

As bandas do SDS-PAGE 12% de hemócitos que apresentaram diferença na intensidade, quando comparada entre os grupos, foram selecionadas e identificadas por ESI-Q-TOF (Figura 22). A identificação das proteínas encontra-se na tabela 6.

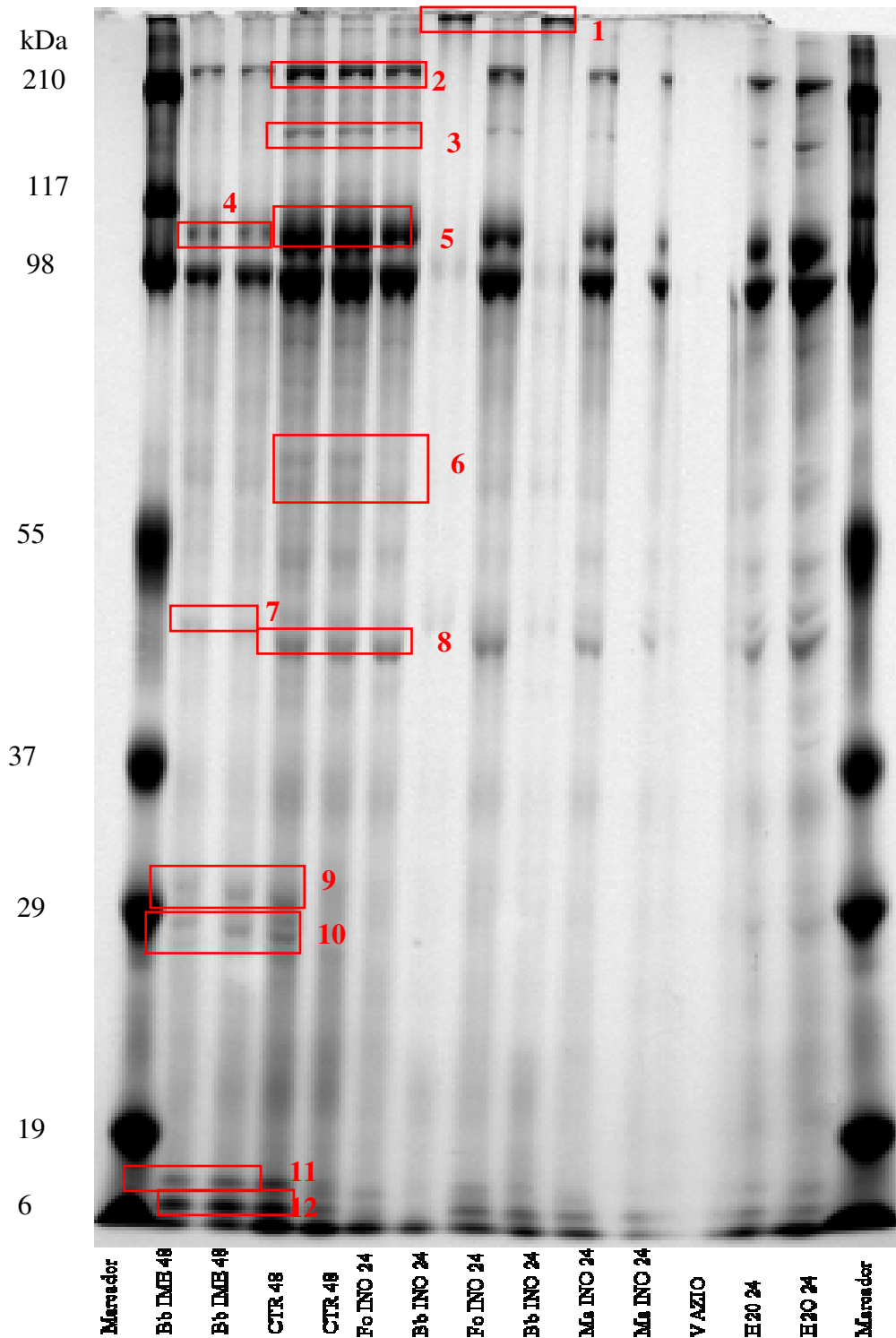


Figura 22. Foto escaneada de SDS-PAGE 12% de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* coletados 24 e 48 horas após o tratamento. As bandas destacadas foram excisadas, hidrolisadas e analisadas por ESI-Q-Tof. Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com Coomassie Coloidal.

Tabela 6. Lista das proteínas identificadas em hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão ou inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Hemolinfa coletada 24 e 48 horas após o tratamento. Identificação realizada por MS/MS.

Número da banda	Proteína	Número da banda	Proteína
1	Vitelogenina (<i>Dermacentor variabilis</i>)	7	Serpina, actina, quitinase
2	Vitelogenina (<i>Rhipicephalus microplus</i>)	8	Vitelogenina
3	Miosina	9	---
4	Queratina humana	10	Actina
5	HeLp	11	Queratina
6	Serpina-3 (<i>Rhipicephalus microplus</i>)	12	Hemoglobina bovina

Foram identificadas as seguintes proteínas relacionadas com *R. microplus*: vitelogenina, HeLp, hemoglobina bovina e inibidores de serinoproteases (serpinas). No entanto, muitas seqüências de peptídeos não foram identificadas. Em relação às alterações encontradas com as serpinas-3, foi observada uma menor expressão nos hemócitos do grupo Bb IME 48 quando comparado com o grupo CTR 48. A menor expressão das serpinas-3 também foi observada com a inoculação dos entomopatógenos *B. bassiana* (Bb INO 24) e *M. anisopliae* s.l. (Ma INO 24) na hemocele de *R. microplus* quando comparados com o grupo controle (H2O 24).

Já a inoculação com *Fusarium* (Fo INO 24) resultou em uma menor expressão das serpinas quando comparado com H2O 24, no entanto essa expressão foi maior do que a dos grupos inoculados com os fungos entomopatogênicos.

4.8 Eletroforese Bidimensional

O grupo inoculado com o fungo *F. oxysporum* apresentou diferenças qualitativas entre os spots quando comparado com o grupo controle, bem como apresentou diferenças quanto a presença ou ausência dos mesmos. No entanto, a infecção com *B. bassiana* proporcionou um perfil muito diferente daquele encontrado nos grupos controle ou inoculado com *F. oxysporum*, demonstrando que a infecção com o entomopatógeno altera o proteoma da hemolinfa do carrapato *R. microplus*. A detecção dos spots foi realizada visualmente e após a excisão, todos os spots foram preparados para análise no MALDI-TOF-TOF, porém a identificação dos peptídeos ainda não foi concluída.

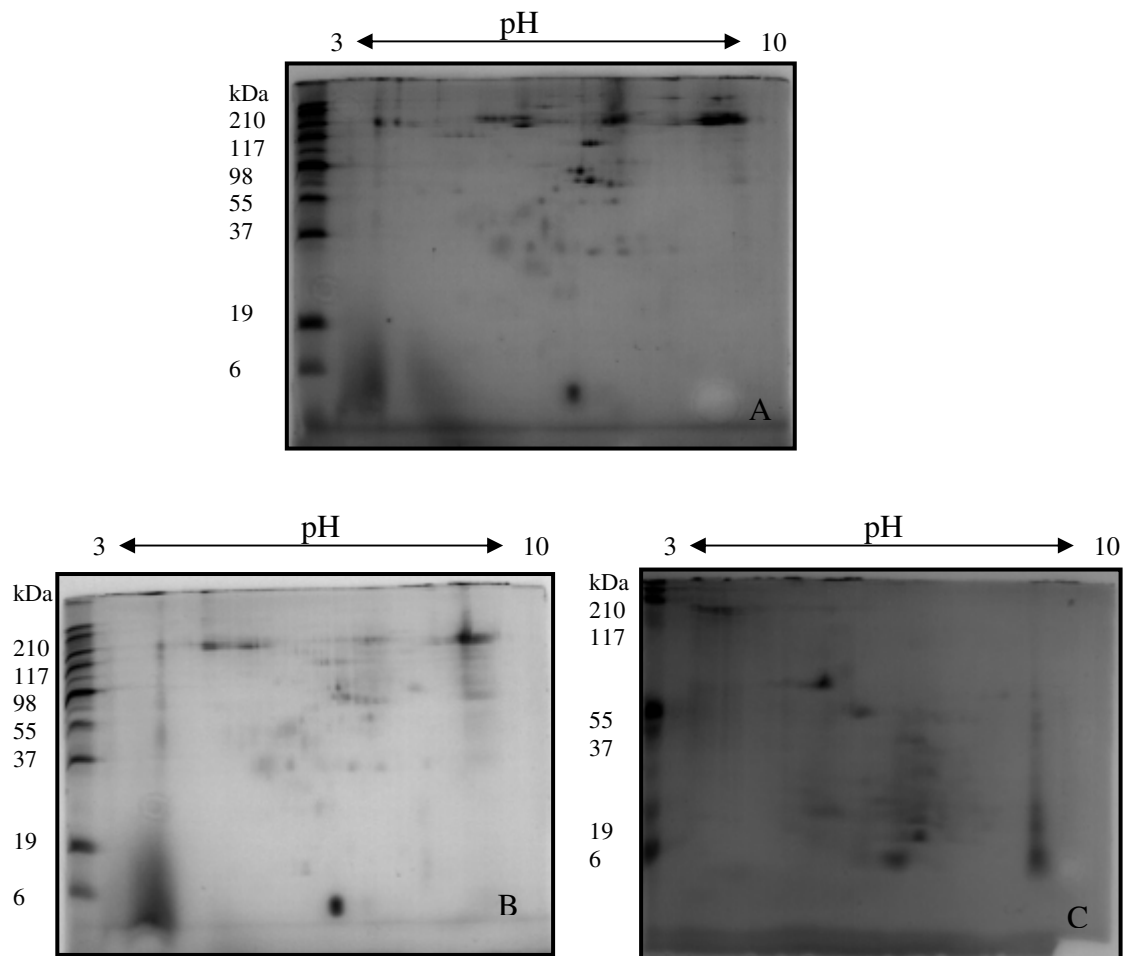


Figura 23. Análise comparativa do gel 2D de proteínas do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com fungos usando tiras IPG (pH 3-10) e SDS-PAGE 15%. A: controle inoculado com água destilada estéril e Tween 80 0,1%; B: inoculação com *Fusarium oxysporum*; C: inoculação com *Beauveria bassiana*. Hemolinfa coletada 24 horas após o tratamento. Padrão de peso molecular indicado a esquerda do gel. Coloração realizada com Coomassie Coloidal. Todos os spots foram excisados do gel,

4.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

4.9.1 Superose

Os cromatogramas obtidos da passagem do plasma da hemolinfa coletada 48 h após o tratamento por imersão na coluna gelfiltração estão apresentados na figura 24. Apenas a hemolinfa do grupo tratado com *B. bassiana* apresentou um perfil cromatográfico diferente do grupo controle. O pico que se iniciou com 42 min foi mais intenso no grupo Bb IME 48 que nos grupos CTR 48, Ma IME 48 e Fo IME 48 (Figura 24); além deste, o plasma da hemolinfa apresentou um segundo pico consecutivo, porém maior que o primeiro. Os dois picos foram

coletados e analisados simultaneamente na coluna analítica C18, e o perfil cromatográfico está demonstrado no item 4.10.3.

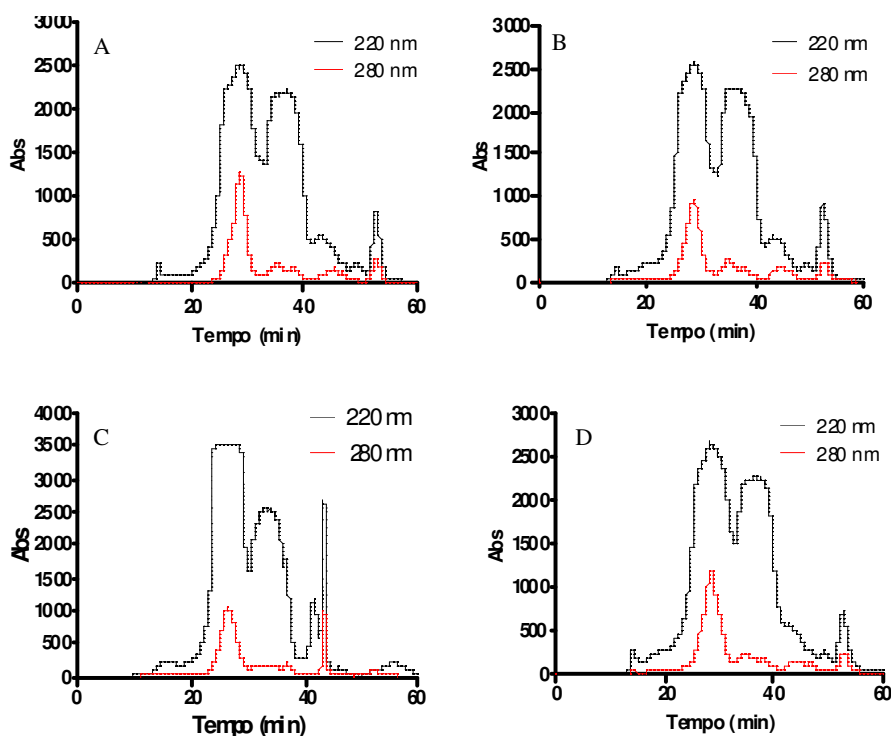


Figura 24. Cromatograma do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* obtido após passagem na coluna Superose. Hemolinfa coletada 48 horas após o tratamento por imersão com os fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. A: grupo controle; B: Ma IME 48; C: Bb IME 48; D: Fo IME 48.

4.9.2 C18

Parte do plasma da hemolinfa que foi filtrado em membrana de 100 kDa (70 μ L) foi aplicado em coluna analítica C18 e os cromatogramas referentes ao tratamento por imersão estão apresentados na figura 25. Os picos iniciais, que aparecem nos primeiros 20 min em todos os grupos, estão relacionados com o tampão no qual a hemolinfa foi mantida após a coleta (30 μ L de coquetel de inibidor de proteases e 82 μ L de tampão NaCl 1,5 M, EDTA 50 mM), como demonstrado na figura 25. Todos os grupos apresentaram um pico com aproximadamente 30 min, com variação de mili-absorbância entre 2500 e 3000, com exceção do grupo Fo IME 24. Com aproximadamente 42 min, um novo pico foi identificado, sendo mais acentuado nos grupos com 48 h, especialmente o grupo Ma IME 48.

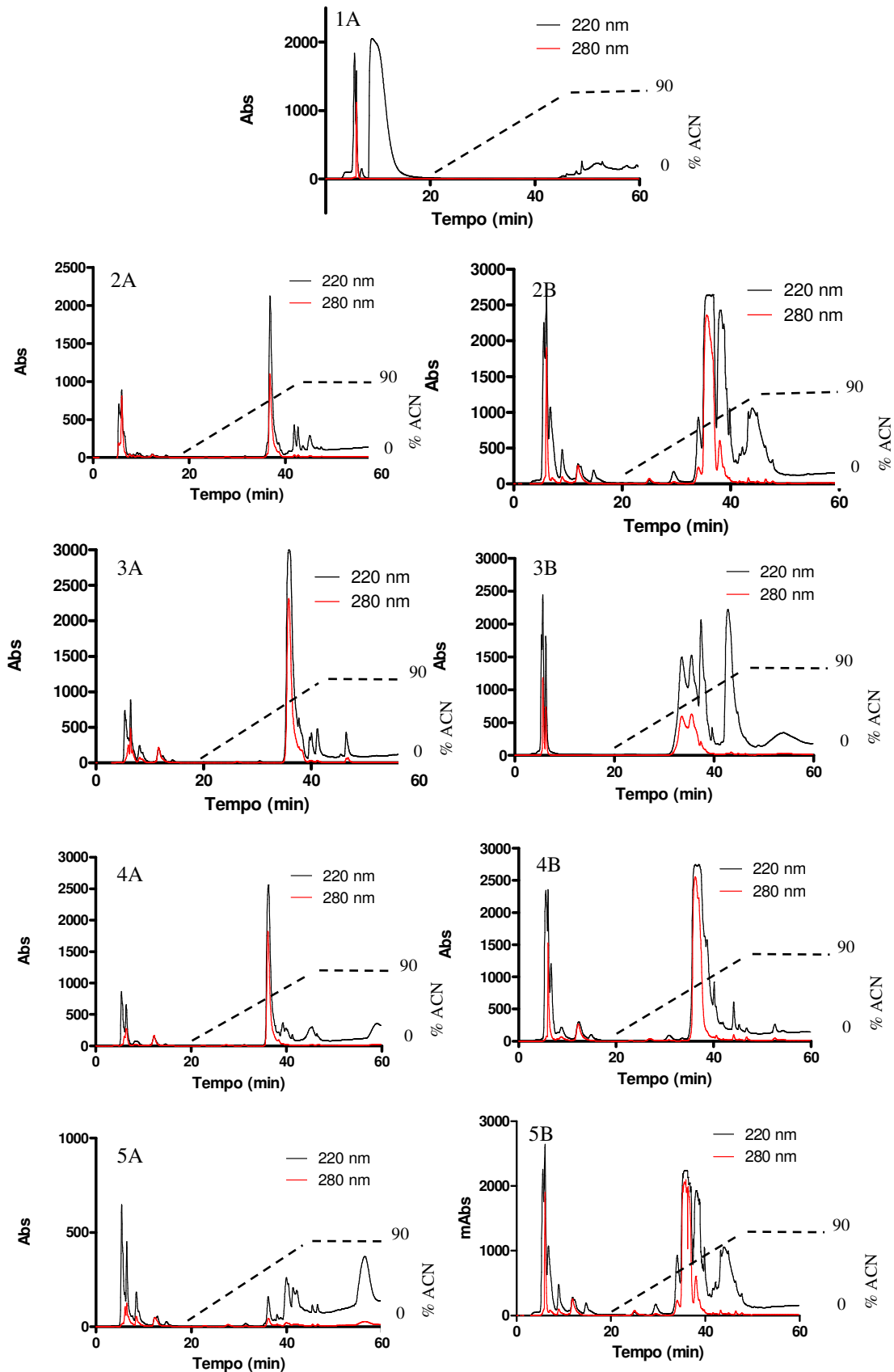


Figura 25. Cromatograma das amostras de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* filtradas em membrana de 100 kDa analisadas na coluna C18. As fêmeas foram tratadas por imersão em suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* e a coleta da hemolinfa realizada 24 horas (A) e 48 horas (B) após a infecção. 1: tampão utilizado na coleta da hemolinfa (coquetel de inibidor de proteases e tampão 1,5 M NaCl, 50mM EDTA); 2: grupo controle; 3: *M. anisopliae* s.l.; 4: *B. bassiana* e 5: *F. oxysporum*.

Em relação ao tratamento por inoculação (Figura 26), o plasma da hemolinfa de todos os grupos manteve os picos iniciados em 38 min e 42 min apresentados nos grupos tratados por imersão. O grupo tratado com *M. anisopliae* s.l. não apresentou o pico iniciado em 42 min, em ambos os tempos de coleta.

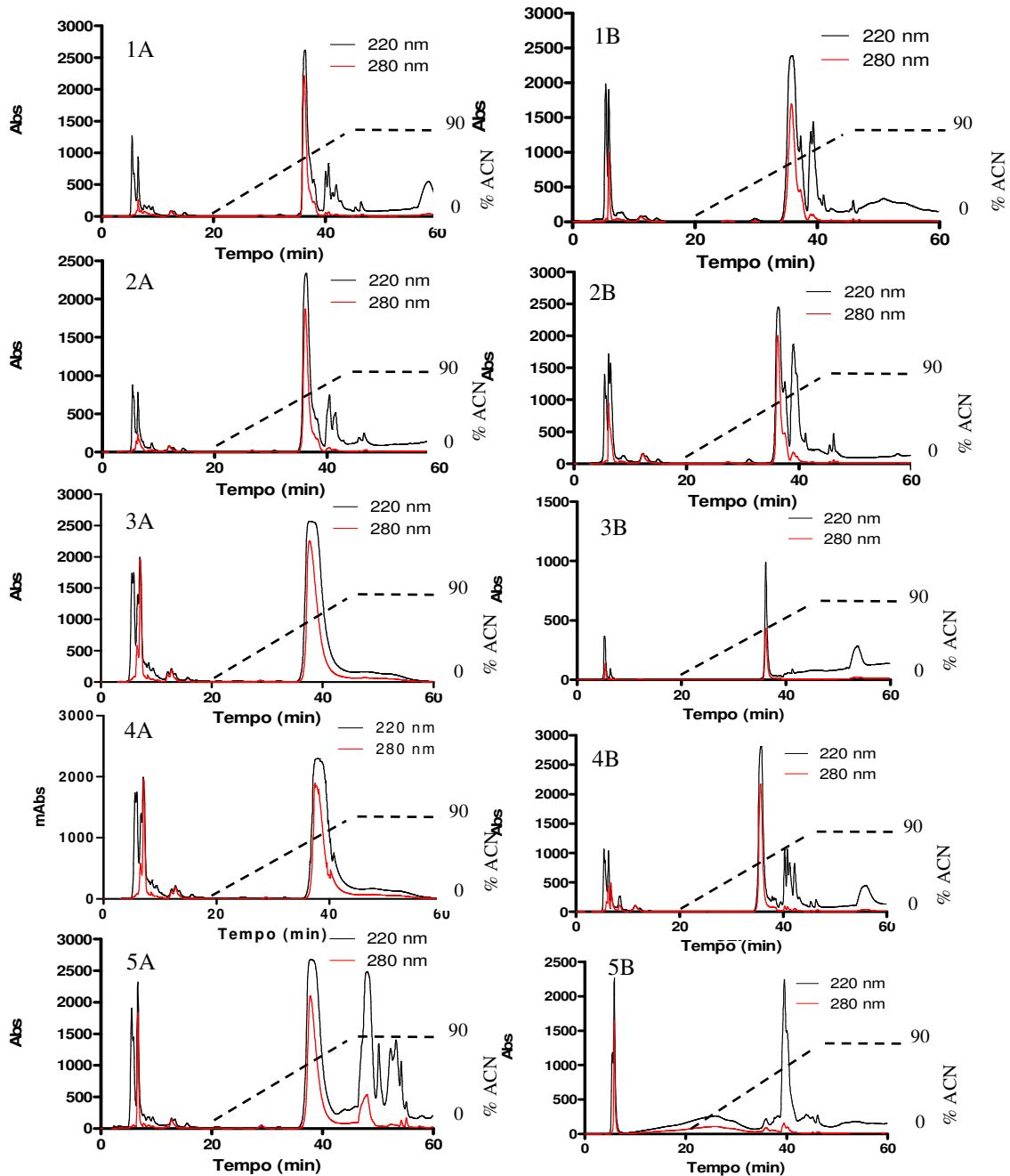


Figura 26. Cromatograma das amostras de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* filtradas em membrana de 100 kDa e analisadas na coluna C18. As fêmeas foram tratadas por inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* e a coleta da hemolinfa realizada 24 horas (A) e 48 horas (B) após a infecção. 1: grupo controle (PICADO); 2: grupo controle (H2O INO); 3: *M. anisopliae* s.l.; 4: *B. bassiana* e 5: *F. oxysporum*.

Os cromatogramas referentes ao filtrado do plasma da hemolinfa em membrana de 10 kDa, no tratamento por imersão, estão representados na figura 27. Com 24 h após a infecção, os grupos tratados com os fungos apresentaram um perfil cromatográfico semelhante: ausência de picos a partir de 20 min de corrida. 48 h após a infecção, a presença de picos iniciados em 38 min e 42 min foi observada em todos os grupos, inclusive no controle (CTR- que não sofreu qualquer tratamento).

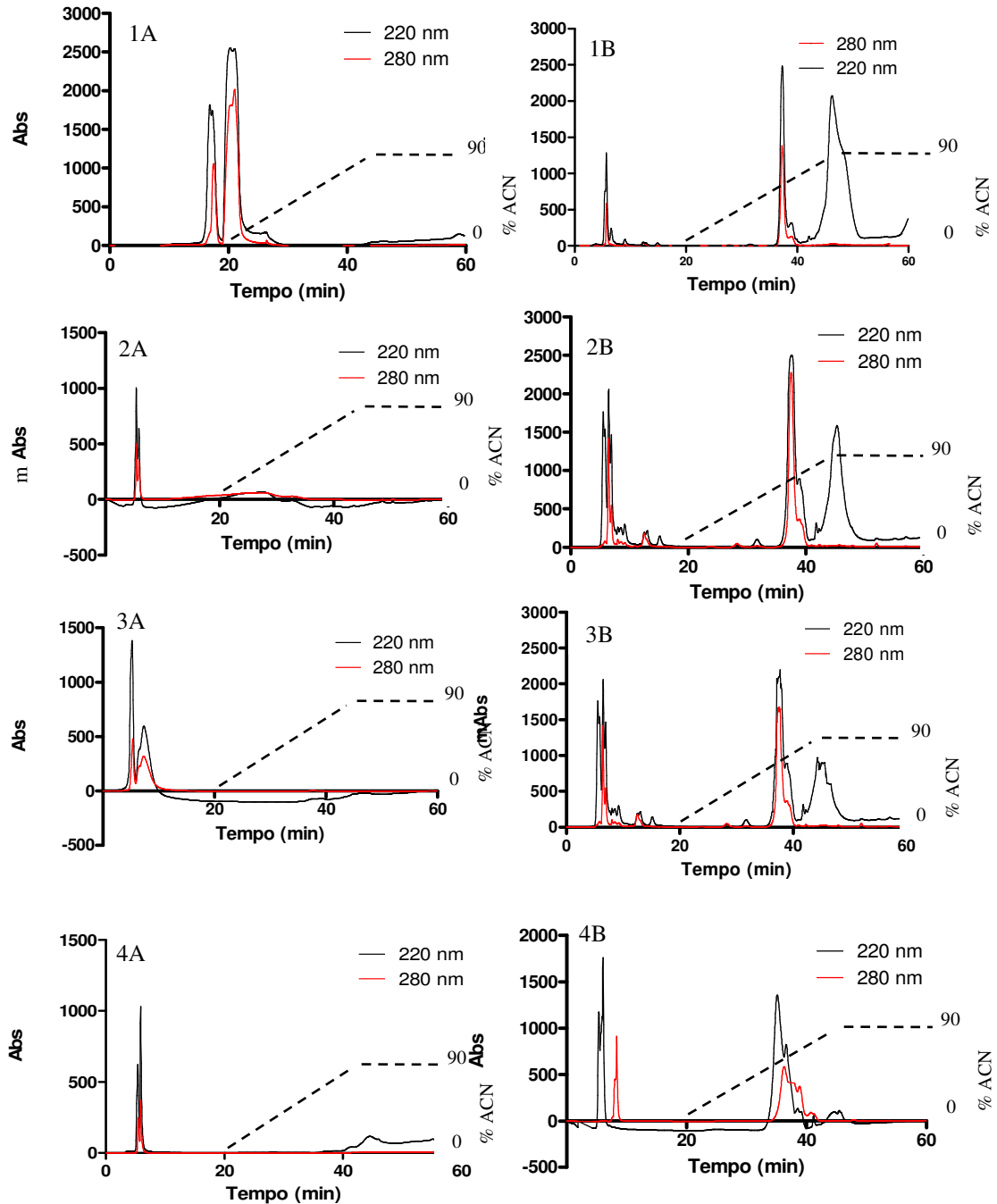


Figura 27. Cromatograma das amostras de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* filtradas em membrana de 10 kDa e analisadas na coluna C18. As fêmeas foram tratadas por imersão em suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* e a coleta da hemolinfa realizada 24 horas (A) e 48 horas (B) após a infecção. 1: grupo controle (que não recebeu qualquer tratamento); 2: *M. anisopliae* s.l.; 3: *B. bassiana* e 4: *F. oxysporum*.

A injúria da inoculação causou o aparecimento do pico iniciado com 38 min somente 48 h após a inoculação (Figuras 28A e 28B). O inóculo quer seja água destilada estéril quer seja suspensão conidial, causou o aparecimento deste pico em todos os grupos com 24 h e 48 h após o tratamento (Figura 28).

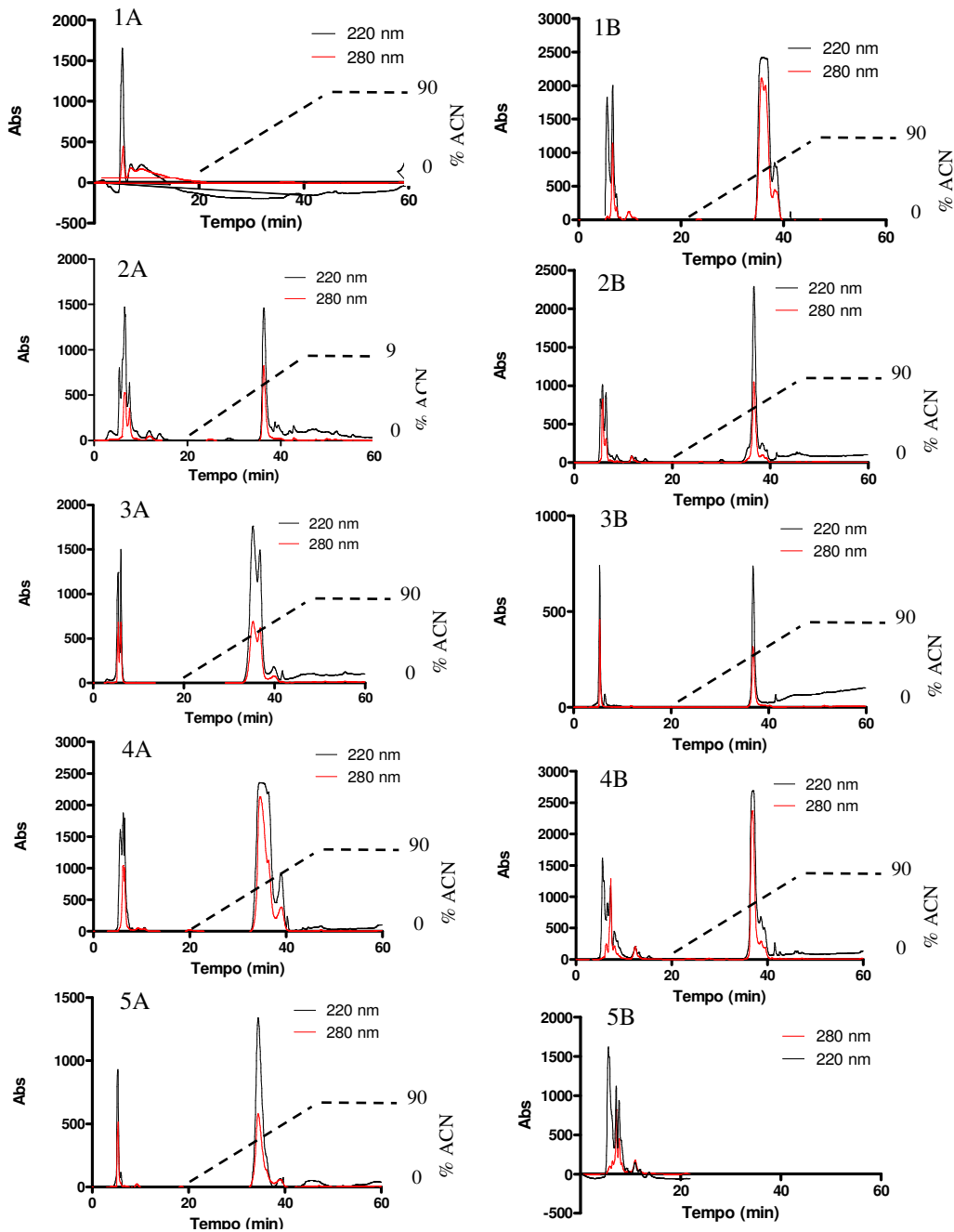


Figura 28. Cromatograma das amostras de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* filtradas em membrana de 10 kDa e analisadas na coluna C18. As fêmeas foram tratadas por inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* e a coleta da hemolinfa realizada 24 horas (A) e 48 horas (B) após a infecção. 1: grupo controle (PICADO); 2: grupo controle (H2O INO); 3: *M. anisopliae* s.l.; 4: *B. bassiana* e 5: *F. oxysporum*.

4.10 Atividade Antimicrobiana do Plasma da Hemolinfa

4.10.1 Teste de difusão em meio sólido – antibiograma

As amostras do plasma da hemolinfa coletadas 24 e 48 h após os tratamentos de imersão e inoculação com os fungos *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* ou *F. oxysporum* não apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*. As amostras do plasma da hemolinfa coletadas 6 h após o tratamento por inoculação também não apresentaram atividade antibacteriana.

4.10.2 Teste de difusão em meio sólido - antifungograma

A amostra do plasma de hemolinfa do grupo Bb IME 48 inibiu o crescimento de *B. bassiana* em meio de cultura com 48 h após a realização do teste de difusão em meio sólido em três discos utilizados, ou seja, 50% da amostra (Figura 29C e 29D). Os halos de inibição apresentaram aproximadamente o mesmo diâmetro (1,1 cm x 1,0 cm). Com 72 h de observação, foram visualizados 2 halos de inibição, com diâmetros de 3,6 cm x 3,2 cm e 1,4 cm x 1,3 cm (Figura 29F) e ainda 2 zonas com redução de crescimento de *B. bassiana* com diâmetros de aproximadamente 1,2 cm x 0,9 cm cada (Figura 29E). A atividade antimicrobiana desta amostra foi duradoura, uma vez que a zona de inibição de crescimento foi mantida por um período de 30 dias em que a placa de Petri foi incubada em condições de temperatura e umidade ideais para o crescimento para *B. bassiana*. As amostras de plasma de hemolinfa dos outros grupos não apresentaram atividade antimicrobiana contra o respectivo fungo utilizado no tratamento. O controle do teste de difusão foi realizado com os discos de papel estéreis, que não interferiram no crescimento de *B. bassiana* (Figuras 29A e 29B).

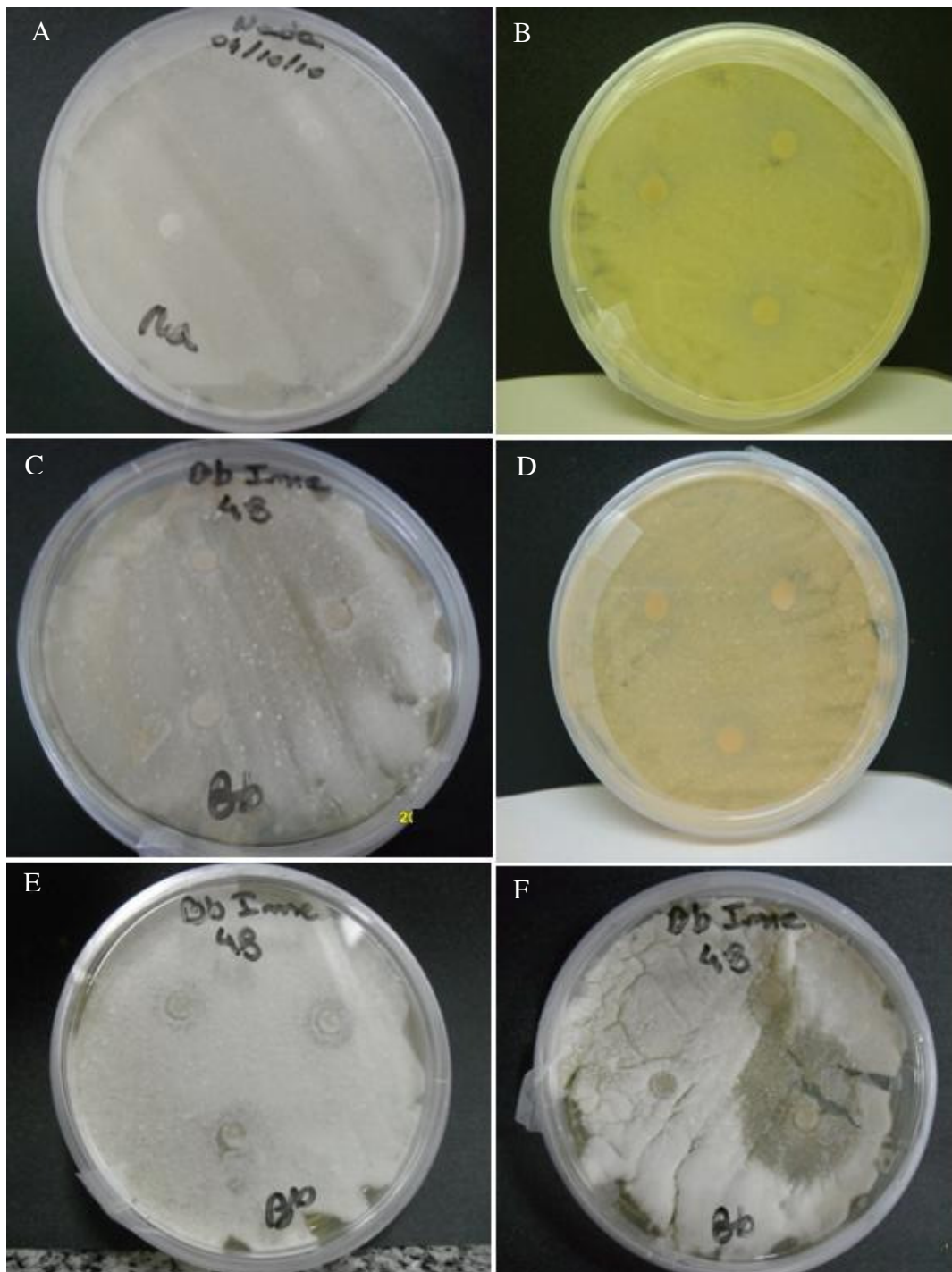


Figura 29. Teste de difusão em meio sólido (antifungigrama) do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão com *Beauveria bassiana* (Bb IME 48). A-D: *B. bassiana* com 48 horas de crescimento em meio de cultivo BDA acrescido de cloranfenicol 0,5%. A: controle do teste de difusão em meio sólido contendo o disco de papel filtro sem qualquer amostra; B: reverso da placa controle do disco de papel filtro; C: inibição do crescimento de *B. bassiana* em três discos de papel; D: reverso da placa mostrando inibição do crescimento de *B. bassiana* em três discos por Bb IME 48. E e F: *B. bassiana* com 72 horas de crescimento em meio de cultivo BDA acrescido de cloranfenicol 0,5%. E: zonas de redução de crescimento ao redor dos discos de papel; F: inibição de crescimento de *B. bassiana*.

4.10.3 Antifungigrama das frações do plasma da hemolinfa do grupo Bb IME 48

A amostra do plasma de hemolinfa do grupo Bb IME 48 que apresentou atividade antimicrobiana contra *B. bassiana* foi aplicada em uma coluna Superose e o perfil cromatográfico está apresentado na figura 30A. A fração obtida dessa gel-filtração, cuja coleta foi iniciada no tempo de 42 min (representada pela seta na figura 30A), foi submetida a FR-CLAE (Fase Reversa da CLAE) em uma coluna analítica C18. As frações eluídas da C18 nos tempos de 25 min (coletada em dois microtubos, por isso denominada 25'00 I e II), 38'30 (I e II), 39'00 (I e II), 43'27 e 45'23 (Figura 30B) tiveram sua atividade antimicrobiana testada contra *B. bassiana* e *C. albicans*. As frações eluídas em gradiente superior a 50% de ACN apresentaram atividade contra *B. bassiana*, porém nenhuma fração apresentou atividade contra *C. albicans*. As observações foram realizadas com 24 h (Figura 31) e 48 h (Figura 32).

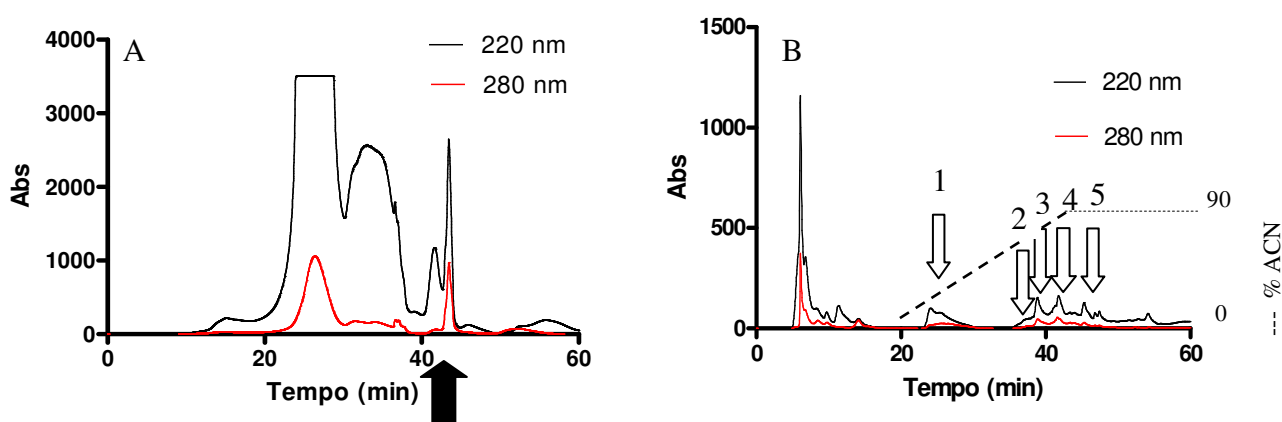


Figura 30. Cromatograma do plasma da hemolinfa com atividade antimicrobiana contra *Beauveria bassiana* (grupo Bb IME 48) obtido após passagem na gelfiltração (coluna Superose) (A). Na figura A, o pico iniciado em 42 minutos (indicado pela seta preenchida) foi coletado e aplicado em uma coluna analítica C18 (B). A atividade das frações representadas pelas setas 1, 2, 3, 4 e 5 foi testada contra *B. bassiana*.

O diâmetro do halo de inibição de crescimento formado em cada fração do plasma da hemolinfa de Bb IME 48, está demonstrado na tabela 7. De um modo geral, as frações coletadas da coluna C18 apresentaram atividade anti-*B. bassiana*, com exceção da fração 1 (coletada em 25 min), que inibiu o crescimento fúngico em apenas um disco. As outras frações, eluídas em mais de 45% ACN apresentaram atividade antimicrobiana, sendo as frações 4 e 5 eluídas em percentual de ACN próximo de 90%, com maior atividade antimicrobiana.

Tabela 7. Atividade antimicrobiana das frações do plasma da hemolinfa de Bb IME 48 obtidas de FR-CLAE em coluna analítica C18. Número de halos de inibição de crescimento de *Beauveria bassiana* formados em cada fração coletada e seus respectivos diâmetros (cm).

Numeração da fração no cromatograma	Tempo de coleta (min's)	Número de halos de inibição formados	Diâmetro dos halos de inibição (cm x cm)
1	25'00 I	1	0,8 x 0,8 cm
1	25'00 II	0	0
2	38'30 I	2	0,9 x 0,7 cm 1,1 x 0,9 cm
2	38'30 II	4	1,0 x 0,9 cm 1,1 x 1,0 cm 1,2 x 1,0 cm 1,4 x 1,1 cm
3	39'00 I	0	0
3	39'00 II	3	1,0 x 0,9 cm 0,7 x 0,7 cm 0,9 x 0,9 cm
4	43'27	4	1,1 x 0,9 cm 0,9 x 0,9 cm 1,0 x 1,0 cm 1,0 x 0,9 cm
5	45'23	6	1,1 x 1,0 cm 1,0 x 1,0 cm 0,9 x 0,9 cm 1,0 x 0,9 cm 0,7 x 0,7 cm 1,1 x 0,9 cm

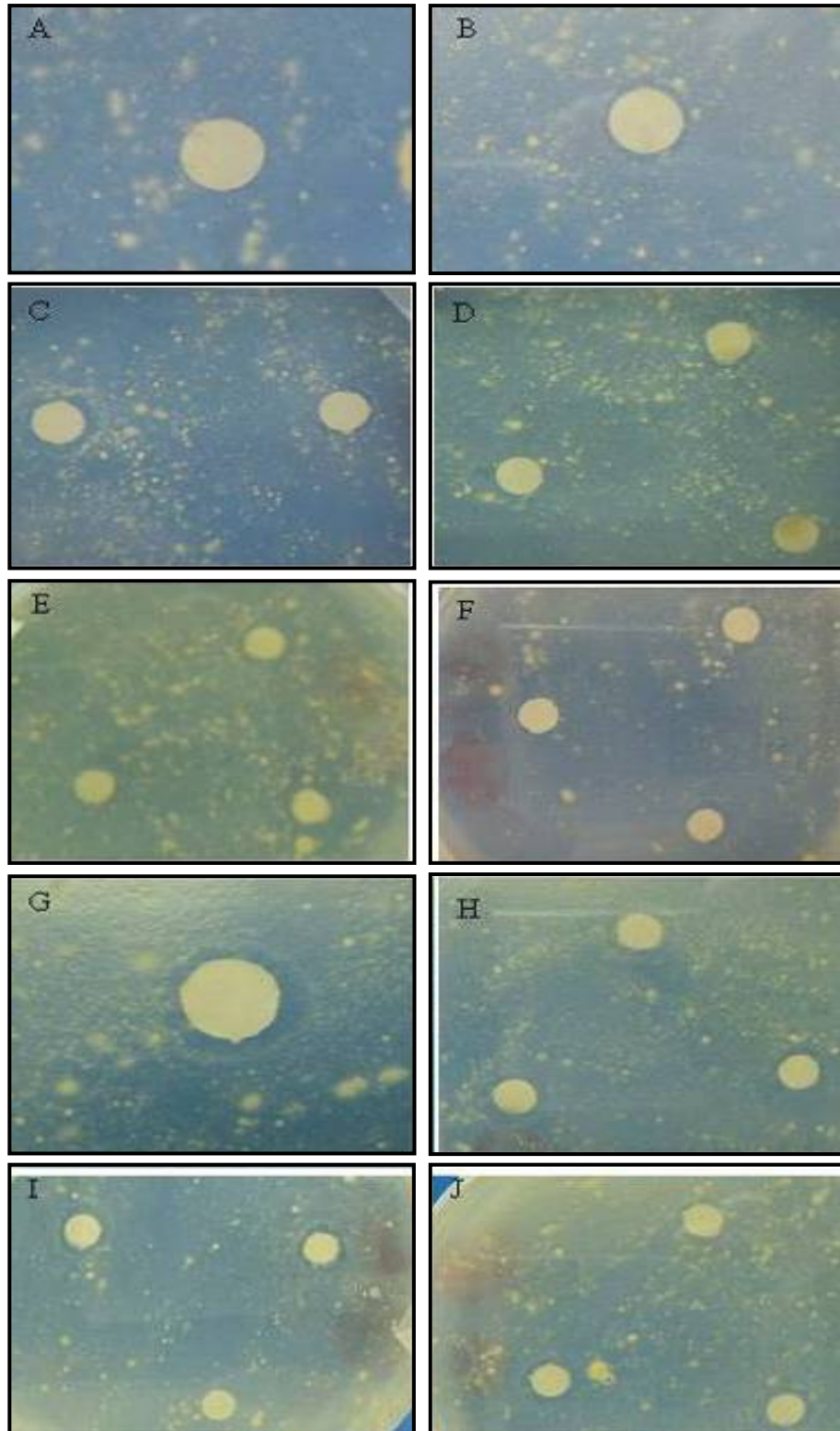


Figura 31. Atividade anti-*Beauveria bassiana* das frações coletadas após passagem do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (grupo Bb IME 48) em coluna analítica C18. Avaliação realizada com 24 horas. A: controle do teste de difusão em meio sólido contendo o disco de papel sem qualquer amostra; B: fração coletada em 25 minutos; C: fração coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo I); D e E: fração coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo II); F: fração coletada em 39 minutos (microtubo II); G e H: fração coletada em 43 minutos e 27 segundos; I e J: fração coletada em 45 minutos e 23 segundos.

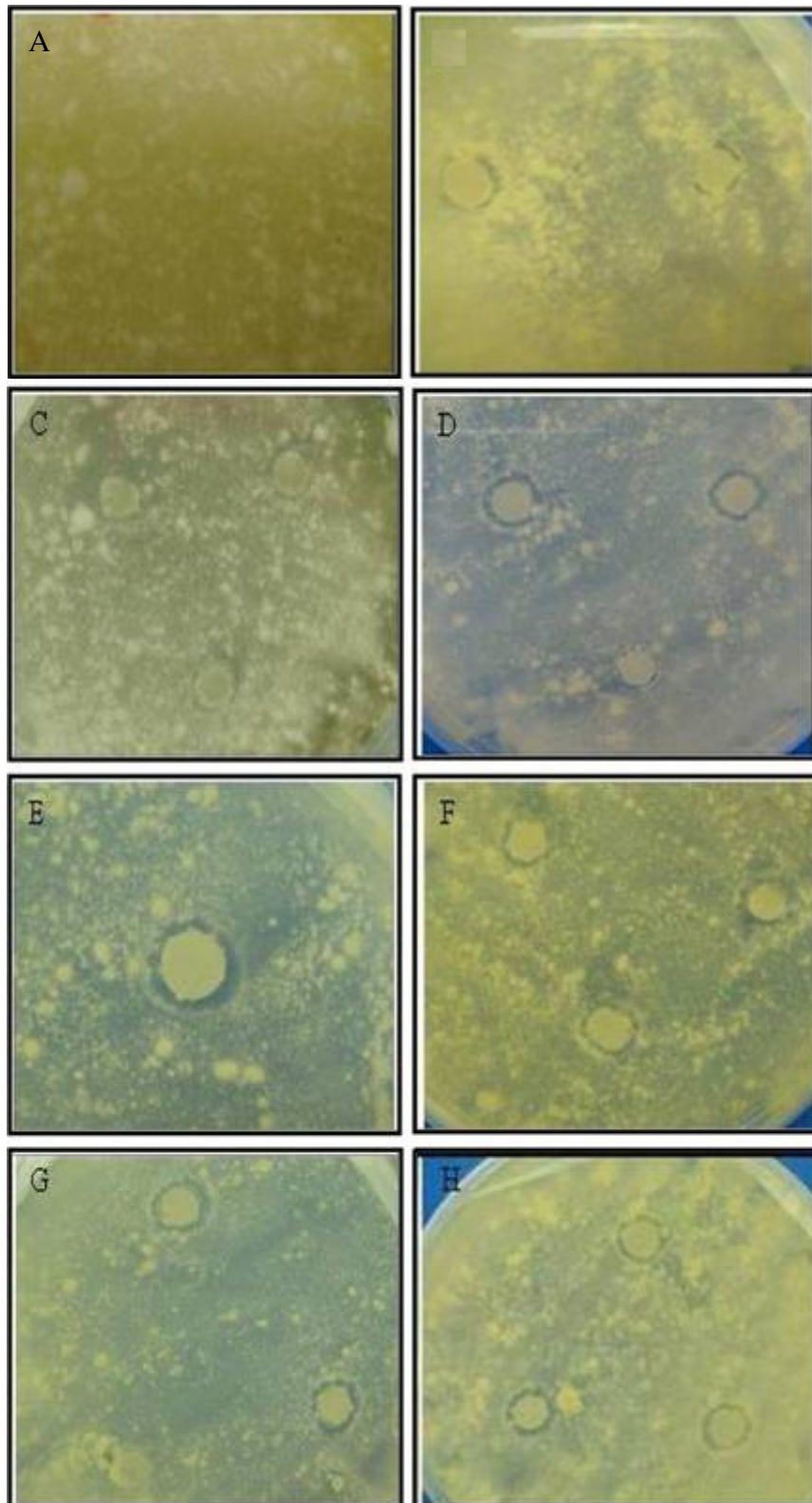


Figura 32. Atividade anti-*Beauveria bassiana* das frações coletadas após passagem do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (grupo Bb IME 48) em coluna analítica C18. Avaliação realizada com 48 horas. A: fração coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo I); B e C: fração coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo II); D: fração coletada em 39 minutos (microtubo II); E e F: fração coletada em 43 minutos e 27 segundos; G e H: fração coletada em 45 minutos e 23 segundos.

Os espectros das frações que apresentaram atividade anti-*B. bassiana* foram analisados por Maldi-Tof e estão apresentados na seguinte ordem: fração coletada em 25 min (microtubo I contendo aproximadamente 1 mL do efluente da coluna) (Anexo E); 38 min e 30 s (microtubo I) (Anexo F); 38 min e 30 s (microtubo II) (Anexo G); 39 min (microtubo II) (Anexo H); 43 min e 27 s (Anexo I); 45 min e 23 s (Figura 33). Todos os espectros foram analisados nos modos refletido (900 a 5.000 Da) e linear (1.000 a 20.000 Da).

O espectro da última fração coletada (45 min e 23 s) apresenta a imagem ampliada do íon com razão m/z 1.119,5, que possivelmente está envolvido com a atividade antimicrobiana das frações do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* infectadas com *B. bassiana*.

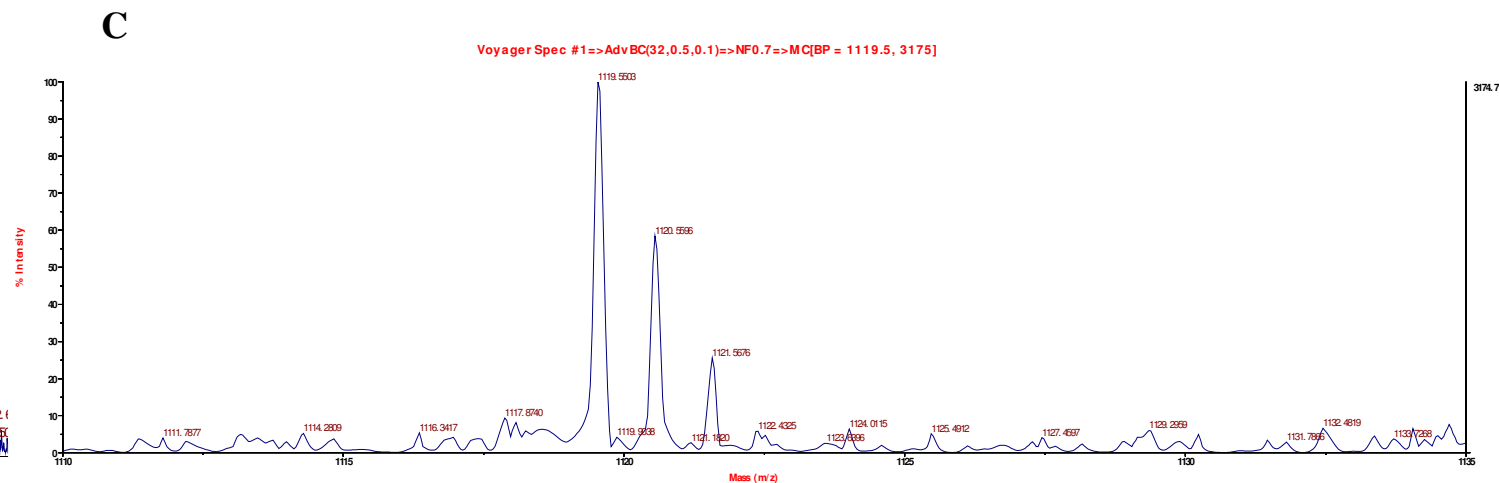
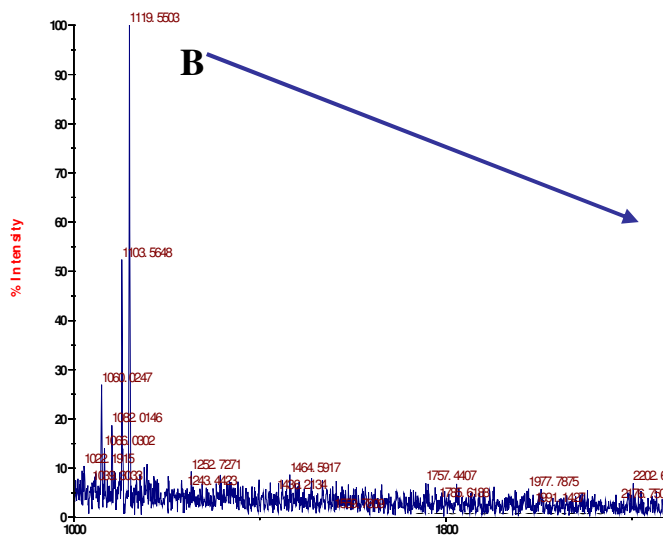
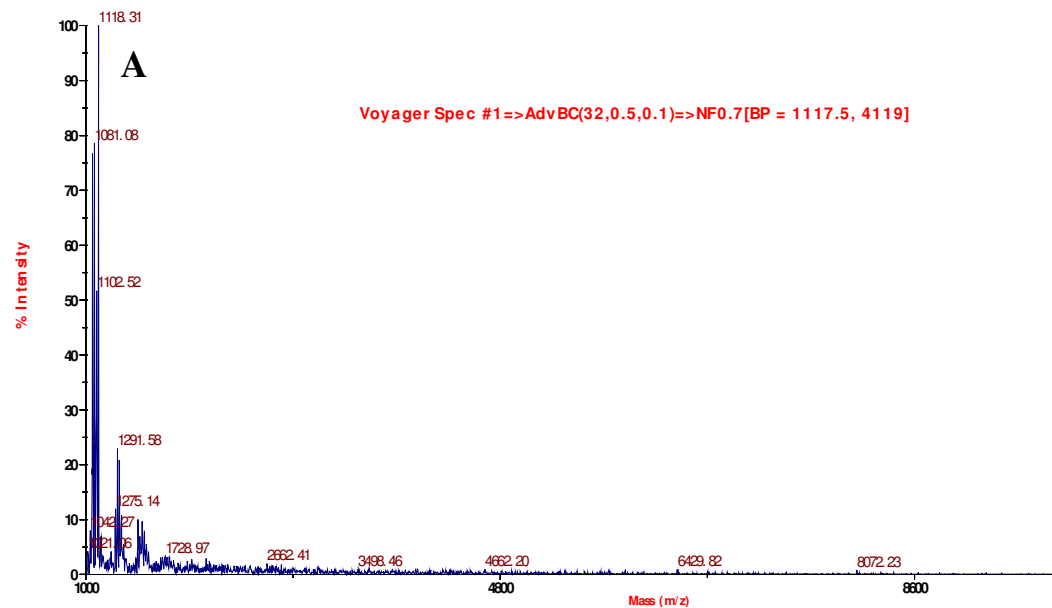


Figura 33. Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 45 minutos e 23 segundos, que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido; C: imagem ampliada do íon m/z 1.119,5.

Outra amostra de Bb IME 48, aplicada na mesma coluna Superose, teve seu pico coletado entre o tempo de 39 min a 52 min (Figura 34A) e armazenado em tubos microtubo por um período aproximado de 2 anos, sem que tivessem sido seco em *speed vac*, ou seja, foi mantido em tampão fosfato pH 7,2 acrescido de 0,1% TFA. Decorrido esse período, este pico foi reaplicado na coluna superose, previamente equilibrada com o mesmo tampão utilizado na primeira passagem, e o perfil cromatográfico da amostra foi mantido, apenas eluído em menor tempo (iniciado com aproximadamente 40 min e finalizado com aproximadamente 47 min). Posteriormente, esse pico foi aplicado em coluna C18 e as frações coletadas foram rastreadas quanto à atividade antimicrobiana contra *B. bassiana*. Uma menor quantidade de frações foi obtida (Figura 34B) quando comparado com o perfil cromatográfico da primeira amostra de Bb IME 48 (Figura 30B). As duas frações (indicadas pelas setas na Figura 34B), coletadas nos tempos de 40 min e 43 min 27 segundos, inibiram o crescimento de *B. bassiana* (Figura 35), e o diâmetro dos halos de inibição de crescimento está demonstrado na tabela 8.

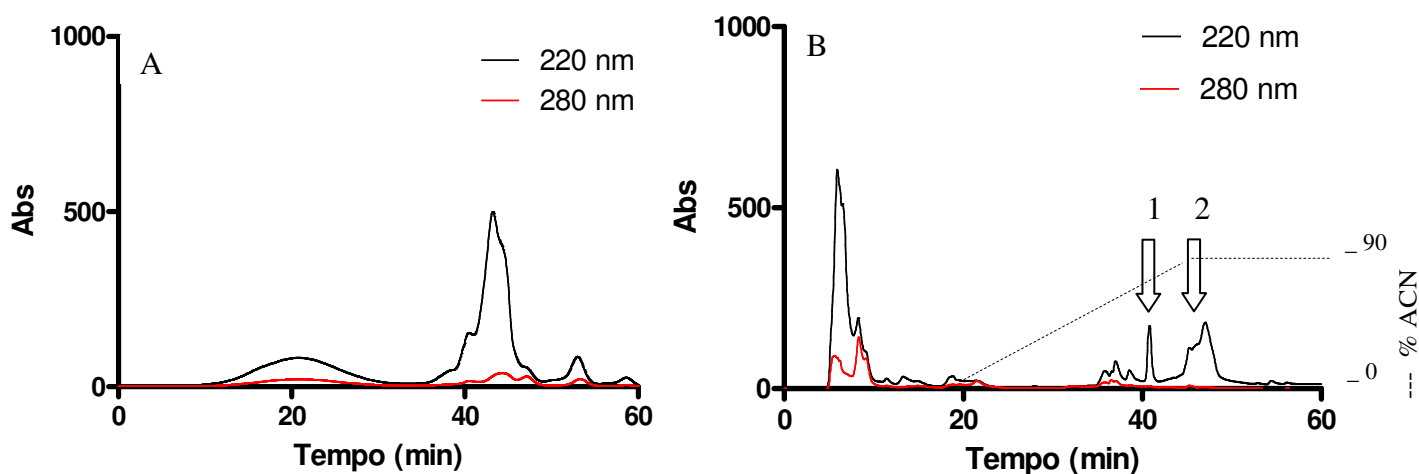


Figura 34. Cromatograma do plasma da hemolinfa do grupo Bb IME 48 que ficou armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 anos. A: cromatograma após passagem na coluna Superose (Gelfiltração). B: o pico iniciado em 40 minutos e finalizado em 47 minutos na gelfiltração foi coletado e aplicado em uma coluna analítica C18. As frações representadas pelas setas apresentaram atividade antimicrobiana contra *Beauveria bassiana*.

Tabela 8. Atividade antimicrobiana do pico do plasma da hemolinfa de Bb IME 48 obtido após passagem em coluna Superose, armazenado a -20 °C durante 2 anos e reaplicadas em FR-CLAE em coluna analítica C18. Quantidade e diâmetro do (s) halo (s) de inibição de crescimento formado (s) em cada fração.

Numeração da fração no cromatograma	Tempo de coleta (min's)	Número de halos de inibição formados	Diâmetro dos halos de inibição (cm x cm)
1	40'00	3	0,8 x 0,8 cm 1,2 x 0,9 cm 1,5 x 1,2 cm
2	46'23	3	1,4 x 1,2 cm 1,3 x 1,3 cm 1,7 x 1,0 cm

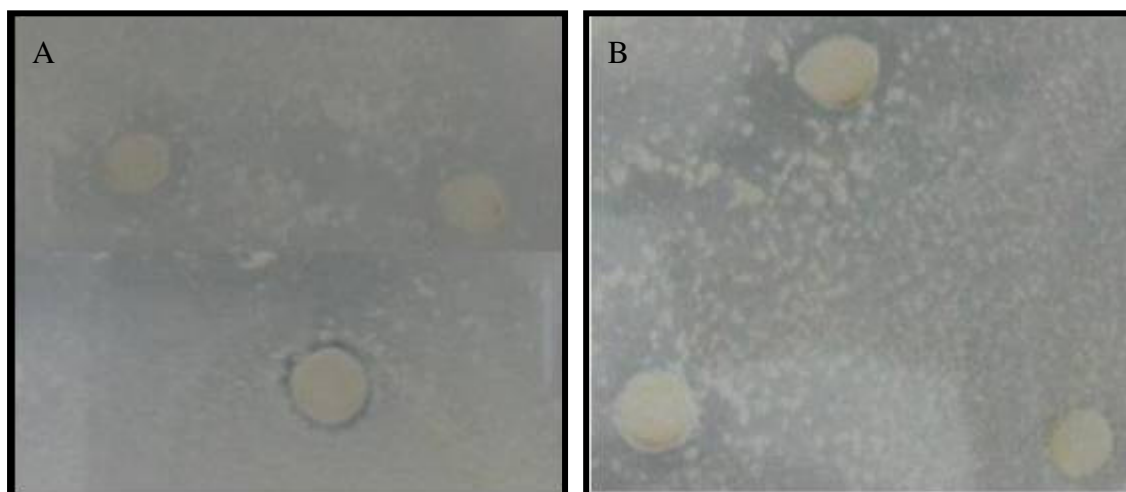


Figura 35. Atividade anti-*Beauveria bassiana* do plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (grupo Bb IME 48). Amostra passada na coluna Superose e posteriormente em coluna analítica C18. Avaliação realizada com 24 horas. A: fração eluída na C18, coletada em 40 minutos; B: fração coletada em 46 minutos e 23 segundos.

A maioria das frações das amostras de Bb IME 48 que apresentaram atividade antimicrobiana anti-*B. bassiana* apresentaram o íon com m/z de 1.119,5 sugerindo que este íon esteja relacionado com a atividade antimicrobiana no plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* infectadas com o fungo entomopatogênico *B. bassiana*. Os espectros das frações 1 (coletada em 40 min) e 2 (coletada em 46 min e 23 s) indicadas pelas setas na figura 34B foram analisados no Maldi-Tof (Anexos J e L, respectivamente).

4.11 Análises dos Lipídeos

4.11.1 Plasma da hemolinfa

O plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* ou *F. oxysporum* apresentou como representantes dos fosfolipídeos a fosfatidilcolina (PC) e o fosfatidilinositol (PI) (Figura 36).

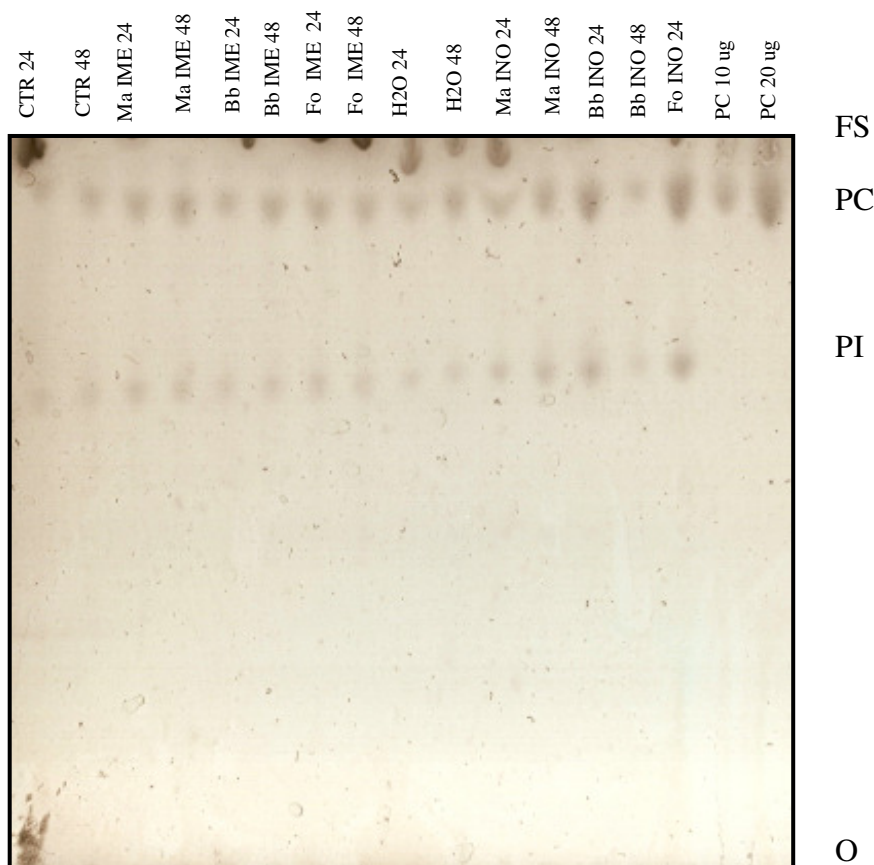


Figura 36. Composição de fosfolipídeos no plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão ou inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à análise densitométrica. FS: frente do solvente; PC: fosfatidilcolina; PI: fosfatidilinositol; O: origem. Cada grupo continha 90 fêmeas.

A PC apresentou maior proporção nas amostras de plasma de hemolinfa e seu percentual variou entre 57,5% e 71,5% nos grupos avaliados (Figura 37). No entanto, os fungos não causaram alterações significativas ($p>0,05$) em ambas as classes de lipídeos quando comparados com seus respectivos grupos controles, em ambos os tempos de observação.

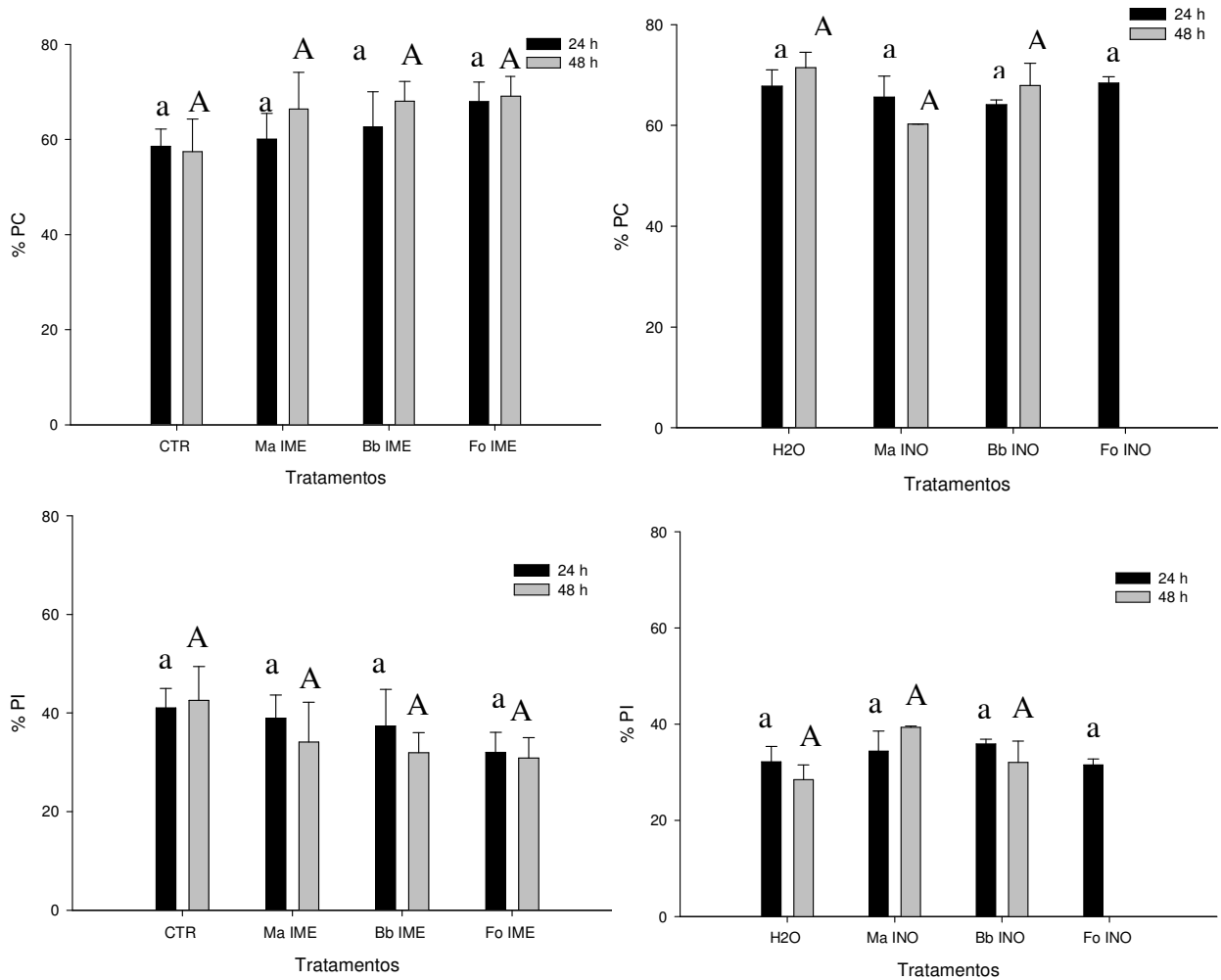


Figura 37. Percentual de fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI) no plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão ou inoculação com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Cada grupo continha 90 fêmeas.

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de SNK.

Os lipídeos neutros foram representados no plasma da hemolinfa de *R. microplus* pelas seguintes classes: CHOE, AG e CHO (Figura 38). A maior proporção destes lipídeos foi representada pelo CHOE, seguida pelo CHO e AG. Os fungos utilizados influenciaram no metabolismo lipídico de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, refletindo em alterações nas classes de lipídeos neutros no plasma da hemolinfa. Essas alterações foram influenciadas pelo tratamento utilizado e o tempo de infecção.

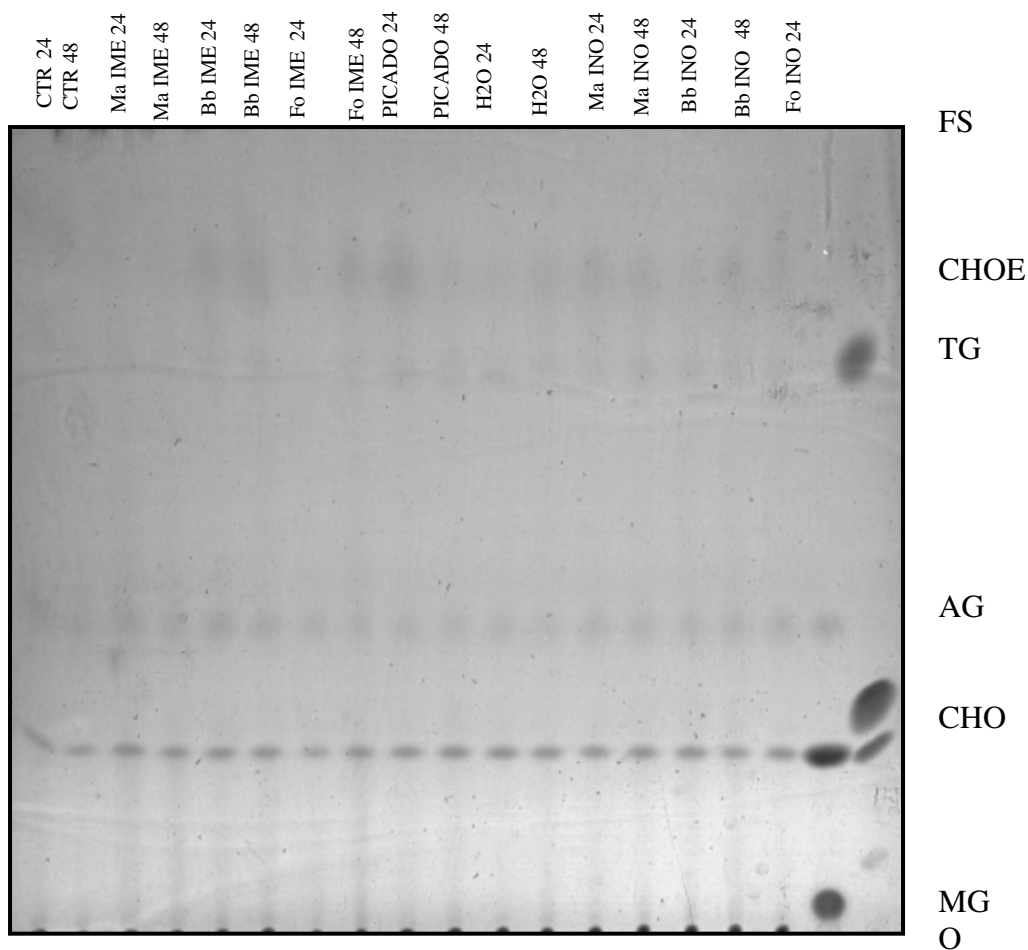


Figura 38. Composição de lipídeos neutros no plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão ou inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à densitometria. FS: frente do solvente; CHOE: colesterol-éster; AG: ácidos graxos livres; CHO: colesterol livre; MG: monoacilglicerol; O: origem. Cada grupo continha 90 fêmeas.

No tratamento por imersão, não houve diferença significativa ($p>0,05$) quando a classe de lipídeo CHOE foi comparada entre os grupos, em ambos os tempos de observação. No tratamento por inoculação, *F. oxysporum* causou aumento significativo ($p<0,05$) de 21% de CHOE no plasma da hemolinfa, quando comparado com o grupo H2O 24 (38,7%), no entanto, 48 h após o tratamento, a quantidade de CHOE foi semelhante ao do controle (H2O 48 - 42,6%; Fo INO 48 - 42,5%). Os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* causaram aumento significativo na quantidade de CHOE de 44% ($p<0,001$) e 21% ($p<0,01$), respectivamente, somente 48 h após o tratamento (Figura 39).

A classe de AG também não sofreu alteração significativa após o tratamento por imersão dos três fungos, em ambos os tempos de observação. No tratamento por inoculação, não ocorreu alteração significativa entre os grupos 24 h após o tratamento, no entanto, com 48 h *M. anisopliae* s.l. causou redução de 237% de AG quando comparado com o grupo controle (H2O 48 - 23,6%; Ma INO 48 - 7,0%). *B. bassiana* reduziu em 26% o AG (BB INO 48 - 18,7%), porém não foi considerado significativo ($p>0,05$). O percentual de AG encontrado no grupo Fo INO 48 foi de 23,0% (Figura 39).

Em relação à última classe de lipídeo neutro (CHO), não foram observadas alterações significativas entre os grupos, em ambos os tratamentos e tempos de observação (Figura 39).

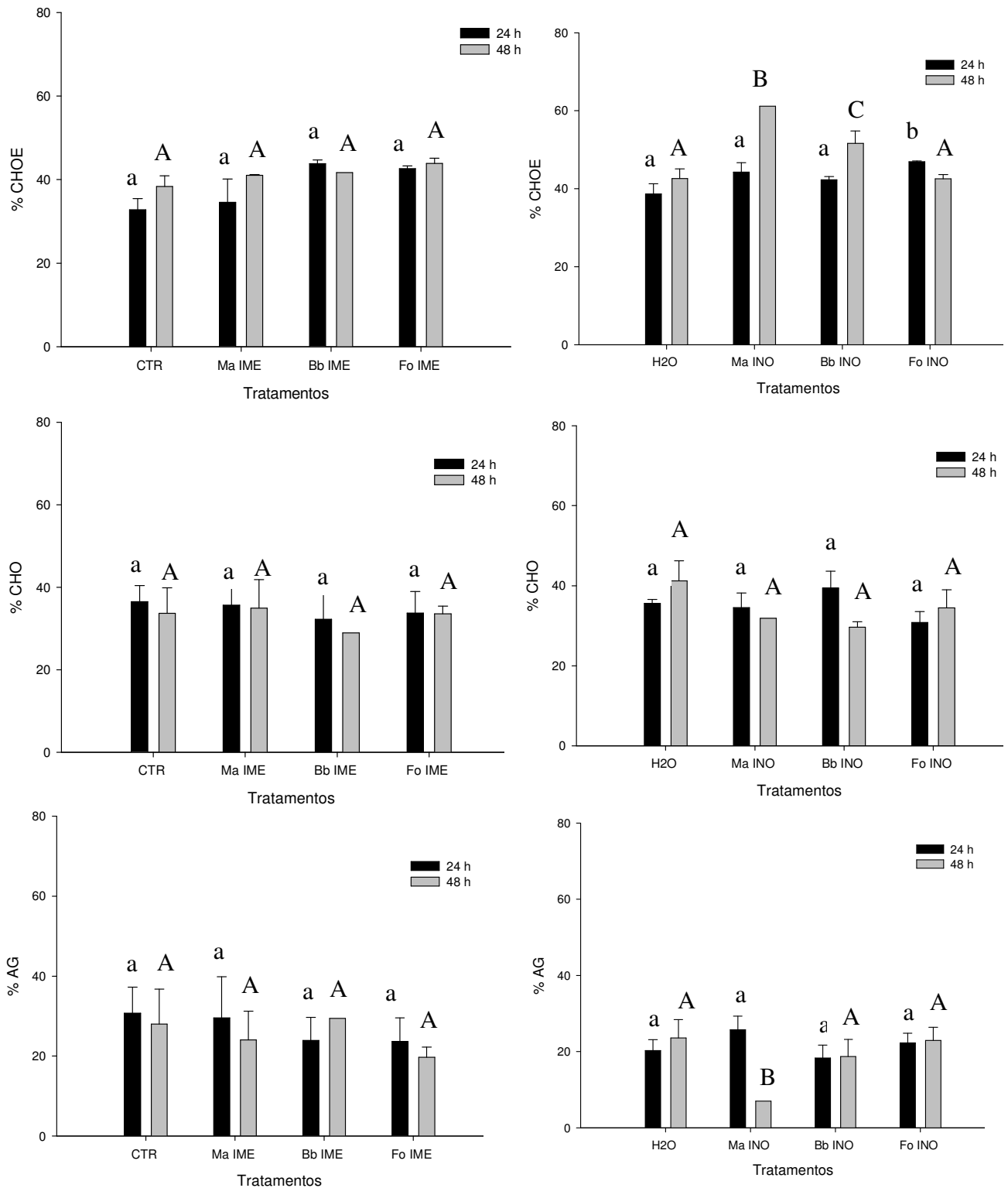


Figura 39. Percentual de ácidos graxos livres (AG), colesterol livre (CHO) e colesterol éster (CHOE) no plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão ou inoculação com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Cada grupo continha 90 fêmeas.

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de SNK.

4.11.2 Hemócitos

Os fosfolipídeos encontrados em hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram PE e PC (Figura 40). Destes, cerca de 60% está representado por PE e 40% por PC. Os lipídeos neutros foram representados pelas classes de AG e CHO (Figura 41), onde o CHO manteve a maior proporção (30%) seguido por AG (25%).

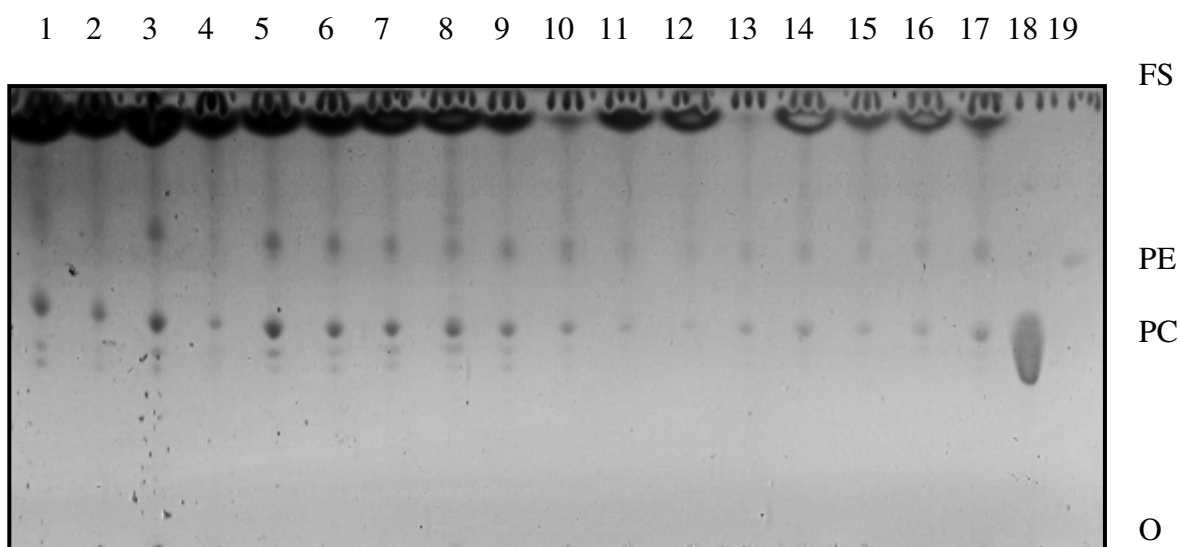


Figura 40. Composição de fosfolipídeos nos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão ou inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência foi escaneada e submetida à densitometria. Lane 1: CTR 24; Lane 2: Ma IME 24; Lane 3: Bb IME 24; Lane 4: Fo IME 24; Lane 5: PICADO 24; Lane 6: H₂O 24; Lane 7: Ma INO 24; Lane 8: Bb INO 24; Lane 9: Fo INO 24; Lane 10: CTR 48; Lane 11: Ma IME 48; Lane 12: Bb IME 48; Lane 13: Fo IME 48; Lane 14: PICADO 48; Lane 15: H₂O 48; Lane 16: Bb INO 48; Lane 17: Fo INO 48; Lane 18: PC (20 µg); Lane 19: PE (20 µg). FS: frente do solvente; PE: fosfatidiletanolamina; PC: fosfatidilcolina; O: origem. Cada grupo continha 90 fêmeas.

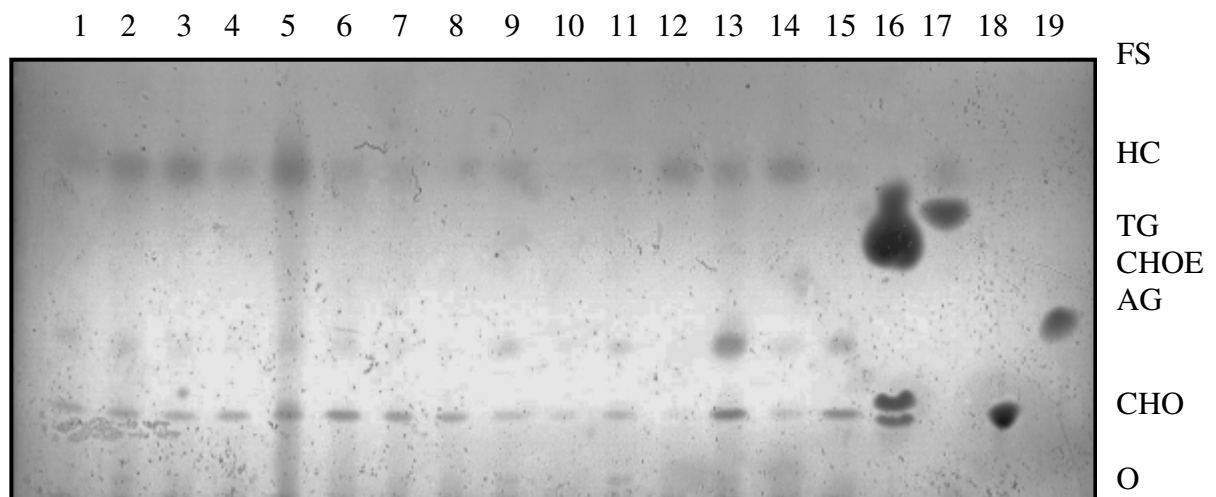


Figura 41. Composição de lipídeos neutros nos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão ou inoculação de suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência foi escaneada e submetida à densitometria. Lane 1: CTR 24; Lane 2: CTR 48; Lane 3: Ma IME 24; Lane 4: Ma IME 48; Lane 5: Bb IME 24; Lane 6: Bb IME 48; Lane 7: Fo IME 24; Lane 8: Fo IME 48; 9: H2O 24; Lane 10: H2O 48; Lane 11: Ma INO 24; Lane 12: Ma INO 48; Lane 13: Bb INO 24; Lane 14: Bb INO 48; Lane 15: Fo INO 24; Lane 16: CHOE e DG (20 µg); Lane 17: TG (20 µg), Lane 18: CHO (20 µg); Lane 19: AG (20 µg). FS: frente do solvente; HC: hidrocarbonetos; CHOE: colesterol-éster; TG: triacilglicerol; AG: ácidos graxos livres; CHO: colesterol livre; MG: monoacilglicerol; O: origem. Cada grupo continha 90 fêmeas.

A alteração no metabolismo lipídico de *R. microplus* infectado com fungos também foi observada nos hemócitos. De um modo geral, a infecção por *B. bassiana* e *M. anisopliae* s.l. alterou a composição tanto de fosfolipídeos (Figura 42) quanto de lipídeos neutros (Figura 43) dos hemócitos 48 h após o tratamento.

O percentual de PE não foi alterado significativamente nos diferentes grupos 24 h após o tratamento por imersão. No entanto, 48 h após a infecção por *B. bassiana* ocorreu redução significativa de PE (Bb IME 48 - 46,5%) quando comparado com o controle (CTR 48 - 61,8%). *M. anisopliae* s.l. (54,3%) e *F. oxysporum* (59,6%) reduziram o percentual de PE, porém essa redução não foi significativa ($p > 0,05$). A inoculação dos fungos não causou alteração significativa em ambos os tempos de observação (Figura 42).

O percentual de PC nos hemócitos, 24 h após o tratamento por imersão, foi menor nos grupos tratados com fungos que no grupo controle, porém não foi significativo ($p > 0,05$). As alterações significativas na classe de PC, assim como observado com PE, só foram notadas 48 h após a infecção por imersão com *B. bassiana*, porém ocorreu aumento do percentual de PC em relação ao grupo controle (Bb IME 48 - 53,5%; CTR 48 - 38,2%). Já no tratamento por inoculação, não ocorreu diferença significativa no percentual de PC entre os grupos (Figura 42).

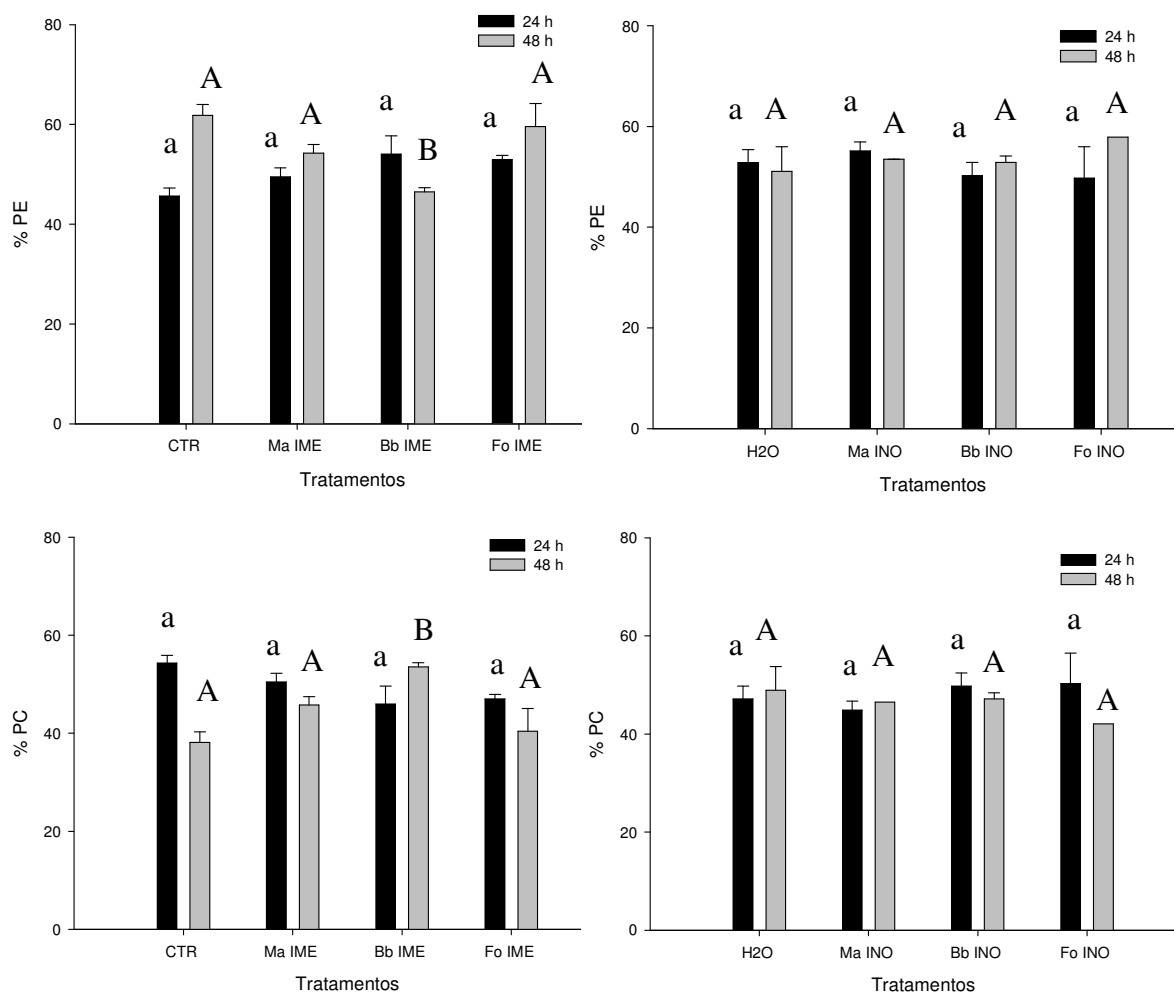


Figura 42. Percentual de fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilcolina (PC) nos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão ou inoculação com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Cada grupo continha 90 fêmeas.

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de SNK.

Em relação aos lipídeos neutros (Figura 43), as diferenças significativas foram observadas no mesmo período de patogenia (48 h), porém somente no tratamento por inoculação nas classes de AG e CHO.

Em relação ao tratamento por inoculação, com 48 h, *M. anisopliae* s.l. reduziu significativamente os percentuais de AG ($p < 0,001$) e CHO ($p < 0,01$), quando comparado com os demais grupos. O percentual de AG nos grupos foi: H2O 48 - 30,9%; Ma INO 48 - 1,7%; Bb INO 48 - 34,2%; Fo INO 48 - 35,8%, enquanto que o percentual de CHO foi H2O 48 - 23,6%; Ma INO 48 - 7,2%; Bb INO 48 - 24,9%; Fo INO 48 - 21,6%.

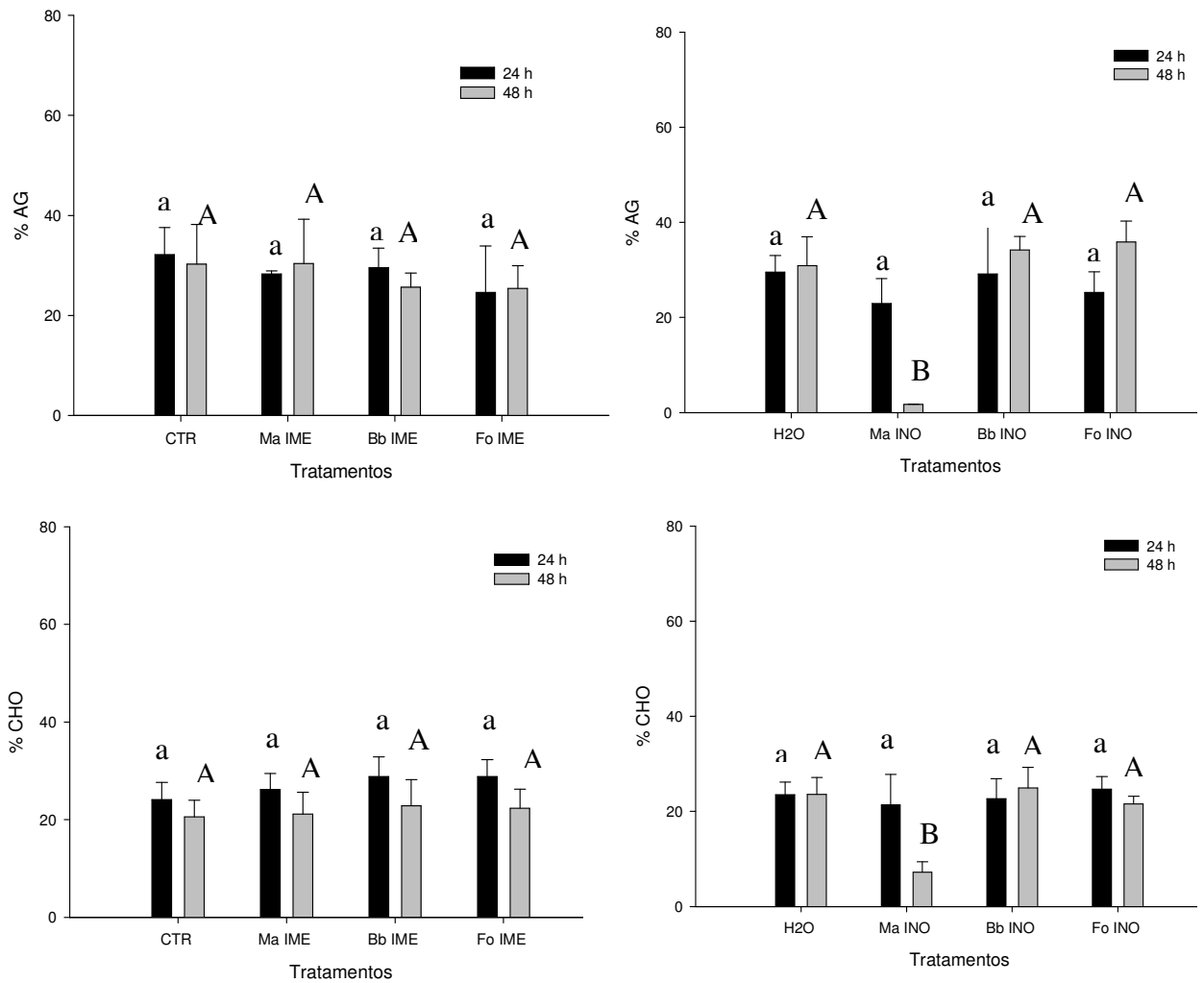


Figura 43. Percentual de ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO) nos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos períodos de 24 e 48 horas após o tratamento por imersão ou inoculação com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Cada grupo continha 90 fêmeas.

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de SNK.

4.11.3 Corpo gorduroso

A composição dos lipídeos neutros encontrados no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* inoculadas com fungos está demonstrado na figura 44. Os lipídeos encontrados foram TG, AG e CHO.

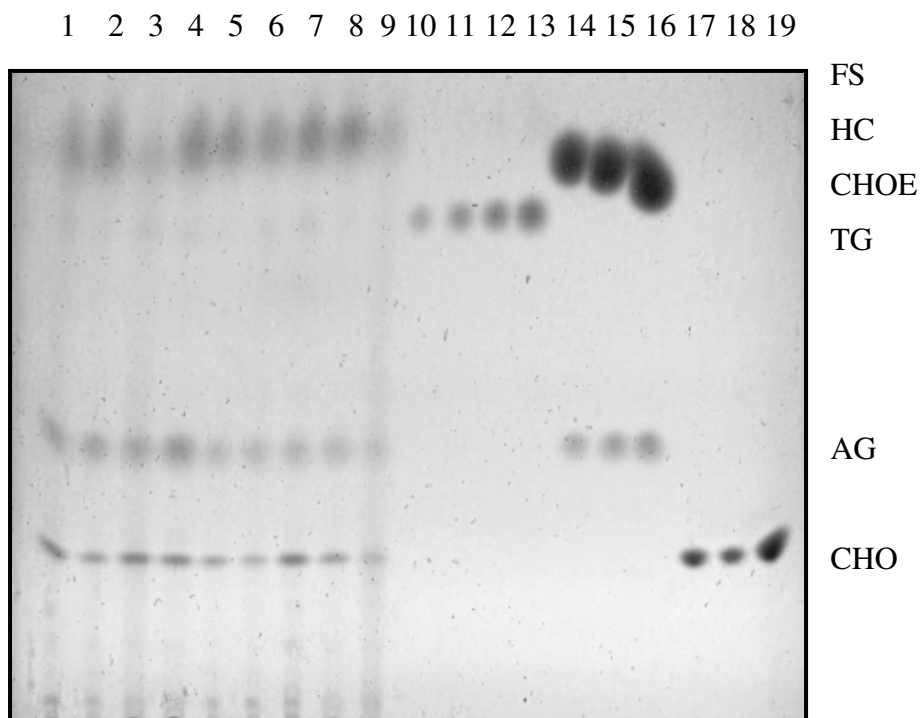


Figura 44. Composição de lipídeos neutros no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à densitometria. Lane 1: CTR 24; Lane 2: CTR 48; Lane 3: H2O 24; Lane 4: H2O 48; Lane 5: Ma INO 24; Lane 6: Ma INO 48; Lane 7: Bb INO 24; Lane 8: Bb INO 48; 9: Fo INO 24; Lane 10-13: padrões de triacilglicerol (TG) nas concentrações 5, 10, 15 e 20 µg respectivamente; Lane 14-16: padrões de colesterol esterificado (CHOE) e ácidos graxos livres (AG) nas concentrações 10, 15 e 20 µg, respectivamente; Lane 17-19: padrões de colesterol livre (CHO) nas concentrações 30, 20 e 40 µg, respectivamente. FS: frente do solvente; O: origem. Cada grupo continha 10 fêmeas.

A quantidade, em μg , de TG, AG e CHO no corpo gorduroso de cada tratamento foi calculada e seu percentual relativo obtido considerando os grupos controles de cada dia de observação como 100% para cada classe de lipídeo avaliada (Figura 45). De um modo geral, *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* causaram alterações em todas as classes de lipídeos, especialmente o fungo *M. anisopliae* s.l. que aumentou a quantidade destes lipídeos em ambos os tempos de observação, dando ênfase ao tempo de 48 h após a infecção.

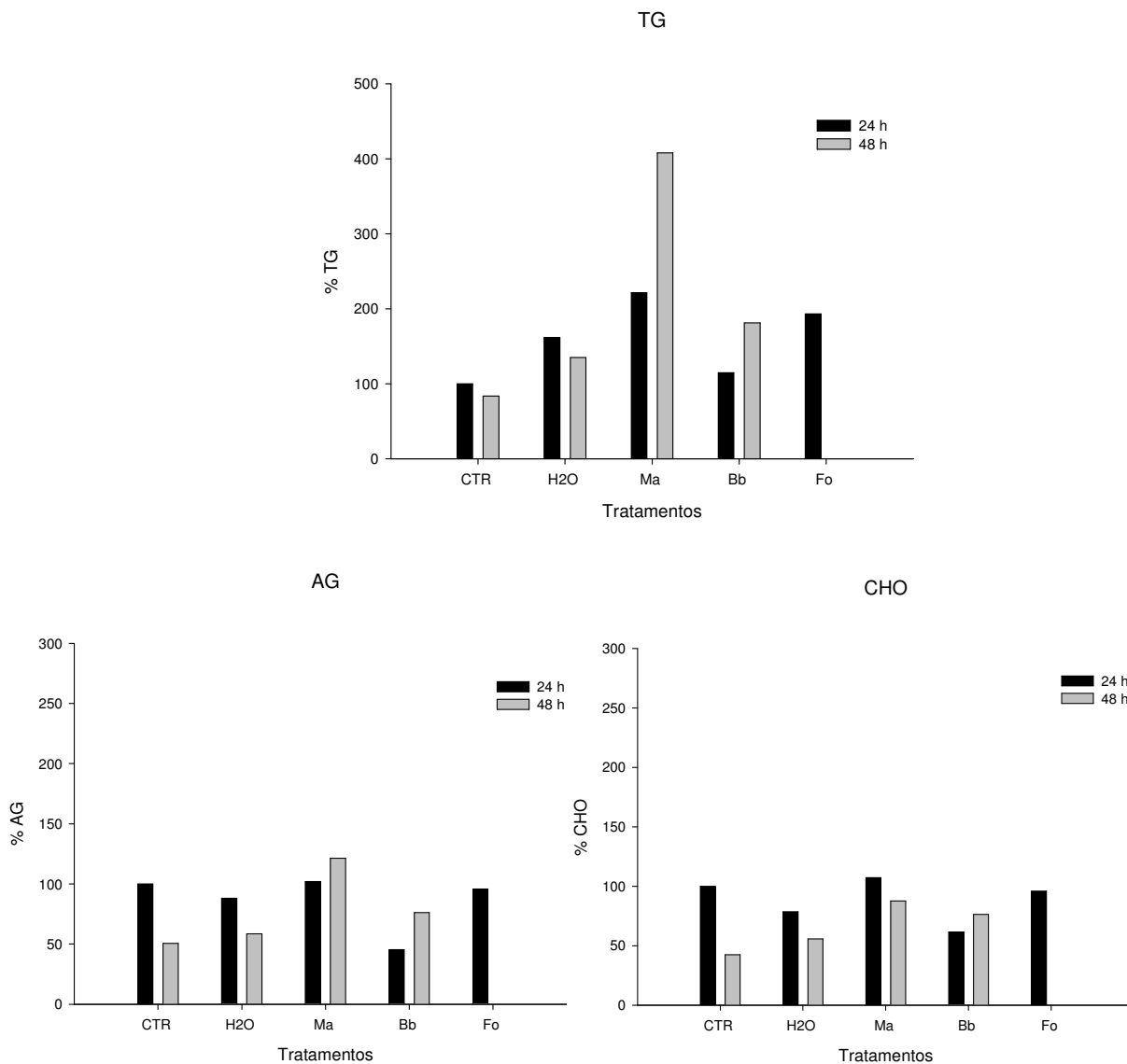


Figura 45. Percentual relativo das alterações quantitativas de triacilglicerol (TG), ácidos graxos livres (AG), colesterol livre (CHO) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* sobre placa de sílica de cromatografia em camada delgada. O grupo controle de cada tempo de observação foi considerado 100%. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Cada grupo continha 10 fêmeas.

O entomopatógeno *B. bassiana* causou redução de cerca de 50% da quantidade de AG 24 h após a infecção, enquanto os demais grupos H2O 24 e Fo INO 24 reduziram 22% e 4,2%, respectivamente (ver figura 45). O grupo Ma INO 24 aumentou a quantidade de AG em relação ao controle, porém esse aumento foi de apenas 2%. Com 48 h após o tratamento, ocorreu aumento de AG em todos os grupos, especialmente após a infecção por *M. anisopliae* s.l. (H2O 48 (15,5%), Ma INO 48 (139,8%) e Bb INO 48 (50,8%)).

A quantidade de CHO nos grupos H2O, Bb INO 24 e Fo INO 24 reduziu 21,3%, 38,5% e 4,1%, respectivamente, comparado ao CTR, 24 h após o tratamento, enquanto que o grupo Ma INO 24 aumentou 7,3% (ver figura 45). Aumentos correspondentes a 31,6%, 106,8% e 80,5% foram observados nos grupos H2O 48, Ma INO 48 e Bb INO 48.

A quantidade de TG foi maior nos grupos inoculados com fungos quando comparados com os grupos controles (CTR e H2O), com exceção do grupo Bb INO 24. A inoculação de água destilada estéril e Tween 80 0,1% na hemocele de *R. microplus* causou alteração na quantidade de TG em ambos os dias de observação (H2O 24 - 61,6% e H2O 48 - 61,3%) e a inoculação dos fungos aumentou ainda mais o percentual deste lipídeo, chegando ao aumento de cerca de 100% na maioria dos grupos (Ma INO 24 - 121,6%; Bb INO 48 - 116,1%; Fo INO 24 - 93,2%), com exceção do grupo Ma INO 48, cujo aumento foi de 387%. O aumento de TG no grupo Bb INO 24 foi de 14,9%, porém a quantidade de TG foi menor do que a do controle positivo (H2O 24). Outro cromatograma, com maior qualidade, demonstra a distribuição de TG entre os grupos estudados (Figura 46). O grupo Ma INO 48 apresentou a maior quantidade de TG.



Figura 46. Composição de triacilglicerol (TG) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com *Metarhizium anisopliae* s.l. ou *Beauveria bassiana* sobre placa de sílica de cromatografia em camada delgada para lipídeos neutros. Lane 1: padrão de TG (20 µg); Lane 2: CTR 24; Lane 3: H2O 24; Lane 4: Ma INO 24; Lane 5: Bb INO 24; Lane 6: CTR 48; Lane 7: Ma INO 48; Lane 8: Bb INO 48. Cada grupo continha 10 fêmeas.

A distribuição das diferentes classes de lipídeos presentes em uma mesma amostra foi observada e o percentual de uma mesma classe comparado entre os grupos de tratamento, em cada tempo de observação, como demonstrado na tabela 9. Não foi observada diferença significativa entre os grupos quando as diferentes classes de lipídeos AG e CHO foram comparadas individualmente e em cada tempo de coleta. No entanto, ocorreu diferença na classe de TG, resultando no aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo Ma INO 48 quando comparado com os demais grupos.

Tabela 9. Distribuição das classes de lipídeos encontradas no corpo gorduroso de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* (Média ± Desvio padrão).

Tratamentos	Classes de lipídeos		
	TG (%)	AG (%)	CHO (%)
CTR 24	11,1 ± 3,3 a	26,3 ± 0,9 a	17,6 ± 5,5 a
CTR 48	15,3 ± 3,2 A	22,2 ± 3,9 A	17,6 ± 10,2 A
H2O 24	15,9 ± 1,7 a	25,4 ± 2,0 a	17,8 ± 7,2 a
H2O 48	16,0 ± 1,1 A	22,6 ± 2,9 A	14,8 ± 6,2 A
Ma 24	14,2 ± 2,4 a	24,1 ± 3,9 a	16,1 ± 6,9 a
Ma 48	23,5 ± 0,8 B	24,7 ± 4,0 A	13,2 ± 5,6 A
Bb 24	15,2 ± 0,6 a	22,9 ± 3,9 a	17,1 ± 6,6 a
Bb 48	17,3 ± 2,3 A	23,8 ± 3,1 A	14,6 ± 5,7 A
Fo 24	14,5 ± 0,3 a	24,2 ± 0,9 a	19,4 ± 8,0 a

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK); letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste SNK.

2 Atividade Lipase no Corpo Gorduroso

A atividade lipase no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* inoculadas com fungos está demonstrada na figura 47. O grupo CTR 24 foi considerado como 100%, obtendo-se então o percentual relativo dos demais grupos. A atividade lipase dos grupos Ma 24 e Bb 24 foi menor que a do grupo controle, enquanto que o grupo inoculado com *F. oxysporum* manteve atividade lipásica semelhante ao do grupo controle. Observou-se que 48 h após a inoculação, todos os grupos apresentaram aumento da atividade lipásica quando comparado com o CTR 24, porém o grupo inoculado com *M. anisopliae* s.l. (Ma INO 48) teve um aumento mais acentuado (aproximadamente 3,5 vezes).

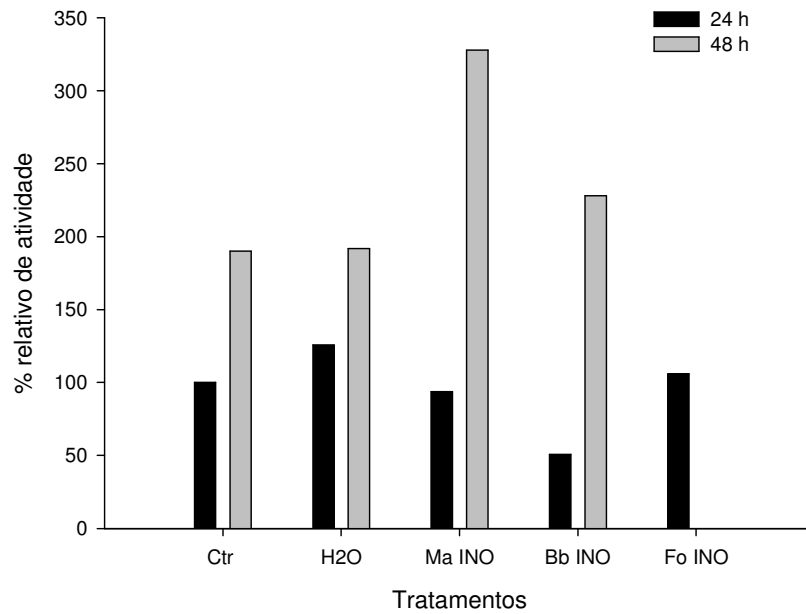


Figura 47. Percentual relativo da atividade lipase no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum*. Cada grupo continha 10 corpos gordurosos. O ensaio foi realizado duas vezes. O percentual da atividade lipase foi obtido por comparação, sendo o grupo controle (CTR) 24 horas considerado como 100%.

5 DISCUSSÃO

5.1 Infecção de *Rhipicephalus microplus* com Fungos

A utilização dos fungos entomopatogênicos vem se tornando uma alternativa promissora no controle de carrapatos de importância médica e médica veterinária. Várias espécies de fungos entomopatogênicos são conhecidas por causar mortalidade em diferentes estágios de desenvolvimento de carrapatos (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008). Recentemente há um grande avanço no entendimento da resposta imune de artrópodes, principalmente dos insetos, cujo modelo é o díptero *Drosophila melanogaster*. No entanto, a resposta imune de carrapatos é pouco compreendida, principalmente após a infecção com fungos entomopatogênicos. O presente estudo mostra alterações protéicas e lipídicas na hemolinfa e no corpo gorduroso de *R. microplus* induzidas pela infecção com os entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* s.l. e *Beauveria bassiana* e com o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*. Além disso, detecta a atividade antimicrobiana no plasma da hemolinfa após o desafio com *B. bassiana*.

Uma das principais vantagens da utilização dos fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos é a especificidade de hospedeiro e o mecanismo de penetração (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010), iniciado a partir da germinação dos conídios. A viabilidade dos conídios presentes em uma suspensão fúngica é importante para propiciar uma infecção bem sucedida, pois haverá a germinação dos conídios e a conseqüente formação do tubo germinativo, relacionados com o início da primeira etapa da penetração do fungo na cutícula do carrapato (BITTENCOURT et al., 1999; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). O percentual de germinação dos conídios de *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* e *F. oxysporum* utilizados nos bioensaios foi de 100%. Portanto, as alterações nos perfis protéico e lipídico observadas na hemolinfa (plasma/hemócitos) e no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* podem ser atribuídas a uma resposta imune desenvolvida a partir da infecção com *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* ou *F. oxysporum*.

No presente trabalho, o processo de infecção dos fungos entomopatogênicos foi demonstrado pela esporulação de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* sobre a cutícula das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* imersas ou inoculadas com as suspensões conidiais e incubadas em condições ideais de temperatura e umidade. Esta é considerada a última etapa do processo de infecção no hospedeiro, em que após o crescimento do fungo na hemocele, há a exaustão dos nutrientes e danos mecânicos, ocorrendo, conseqüentemente, a morte do hospedeiro e exteriorização do fungo em busca de novos hospedeiros para dar continuidade ao seu ciclo (CHANDLER et al., 2000).

O período necessário para a observação do desenvolvimento da colônia fúngica sobre a cutícula do carrapato variou em função do tratamento empregado e do entomopatógeno utilizado. Segundo Chandler et al. (2000), o período necessário para que ocorra a esporulação do fungo sobre a superfície do corpo de seu hospedeiro varia de três a 10 dias. No tratamento por imersão, a esporulação somente foi observada no oitavo dia após o tratamento com *B. bassiana*. As fêmeas tratadas com *M. anisopliae* s.l. não apresentaram desenvolvimento de colônia sobre a cutícula, embora tenham apresentado sinais da infecção, tais como redução ou não realização de postura, diminuição de peso e alteração da coloração da cutícula, desde o quarto dia após tratamento. O fato de não ter ocorrido essa esporulação provavelmente se deve ao pequeno período de observação. Angelo et al. (2010) observaram a esporulação do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii* sobre o cadáver de fêmeas de *R. microplus* somente no décimo após o tratamento por imersão. O mesmo tempo foi necessário para que

houvesse a esporulação de *Isaria farinosa* sobre a mesma espécie de carrapato (ANGELO, 2007). Em *Rhipicephalus annulatus*, os fungos *M. anisopliae* e *M. flavoviridae* (= *M. acridum*) também colonizaram as superfícies dorsal e ventral dos cadáveres de fêmeas ingurgitadas após tratamento (GINDIN, et al., 2001). Em contrapartida, os autores relataram que o isolado de *B. bassiana*, não emergiu da cutícula do carrapato mas sim através das aberturas naturais. No presente trabalho, o isolado de *B. bassiana* (Bb 986) emergiu de toda a superfície da cutícula. Gindin et al. (2001) relataram que os primeiros sinais de infecção foram observados de 3 a 5 dias após o tratamento, porém não mencionaram o tempo necessário para esporulação dos fungos sobre os carrapatos.

No tratamento por inoculação, a esporulação de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* sobre a cutícula das fêmeas de *R. microplus* foi observada no quarto dia após o tratamento. O fato desta esporulação ter sido observada em menor tempo se deve ao fato do fungo ter sido inoculado diretamente no interior da hemocele do carrapato, reduzindo o tempo necessário à etapa de penetração do fungo, que em condições favoráveis, ocorre de 24 a 48 h (ALVES, 1998). Portanto, a patogenia causada pelo fungo inoculado na hemocele do carrapato é iniciada em um período menor quando comparada com a patogenia causada pelo fungo cujo tratamento se deu por imersão.

O isolado DOA-23 de *F. oxysporum* não colonizou a superfície da cutícula das fêmeas de *R. microplus* no presente trabalho, independente dos tempos de observação e do tratamento utilizado. Por ser um fungo fitopatogênico, não dispõe de enzimas específicas necessárias para a penetração na cutícula dos artrópodes e/ou esporulação sobre a mesma. Segundo Lubeck et al. (2008), para que ocorra a penetração dos fungos entomopatogênicos, é necessária a ação sinérgica de diferentes enzimas tais como proteases, quitinases e lípases específicas, pois a cutícula dos artrópodes apresenta composição complexa. Desta maneira, as fêmeas imersas em suspensão conidial de *F. oxysporum* apresentaram postura semelhante àquela observada nas fêmeas do grupo controle, porém as fêmeas que foram inoculadas com este fungo foram afetadas, pois o fungo conseguiu se desenvolver na hemocele das fêmeas.

Para a manutenção dos isolados de *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* e *F. oxysporum* no laboratório foram realizados cultivos repetidos em meio artificial. A sucessão de cultivos dos isolados de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* em meios artificiais pode promover a redução da virulência do fungo (ALVES, 1998), no entanto, alguns isolados de *B. bassiana* parece ser menos sensíveis a essa repetição de cultivos e mantém sua virulência para artrópodes (BROWNBRIDGE et al., 2001).

Estudos demonstraram que a virulência dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* pode ser recuperada quando ocorre a passagem *in vivo* por um hospedeiro artrópode (FARGUES; ROBERT, 1983; FRAZZON et al., 2000). Este fato foi observado com o isolado de *M. anisopliae* s.l. utilizado neste trabalho, que ao apresentar redução da virulência, foi reisolado de fêmeas de *R. microplus* após infecção *in vivo* e teve sua virulência recuperada. A partir do seu cultivo deste isolado em meio artificial, a concentração conidial de *M. anisopliae* s.l. inicialmente utilizada (10^8 conídios mL⁻¹) se tornou letal para o carrapato no tratamento por inoculação, promovendo a fragilidade e/ou destruição dos tecidos a partir das primeiras 48 horas (ver figura 7), impossibilitando a coleta da hemolinfa devido ao extravazamento de conteúdo intestinal. Inevitavelmente, o grupo Ma INO 48 ficou ausente em algumas modalidades avaliadas.

Durante os repetidos cultivos do isolado de *F. oxysporum* em meio artificial, algumas características macromorfológicas do fungo foram alteradas, havendo então a necessidade da obtenção de uma nova colônia do isolado DOA-23 de *F. oxysporum*. Os bioensaios realizados a partir dos novos cultivos desta colônia foram prejudicados, acarretando também a impossibilidade da coleta da hemolinfa do grupo Fo INO 48. Embora este isolado não seja entomopatogênico, a destruição dos tecidos observada neste grupo (ver figura 7)

provavelmente ocorreu por pressão mecânica promovida pelo intenso crescimento das hifas no interior da hemocele. A redução da concentração conidial para 10^7 conídios mL⁻¹ foi realizada na tentativa de manter este grupo nos bioensaios, porém esta manobra não foi bem sucedida, ocasionando a ausência deste grupo em algumas avaliações.

5.2 Perfil Protéico de *R. microplus* após desafio microbiano

5.2.1 Concentração de proteína total

Em artrópodes, o sistema imune inato, que compreende resposta celular e humoral, é ativado por proteínas do hospedeiro que reconhecem determinantes de superfícies de patógenos tais como lipopolissacarídeo (LPS), ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicano (PGN) de bactérias e β -1,3-glicano de fungos (MEDZHITOV; JANEWAY, 2002). Na resposta imune humoral há a liberação de proteínas ou peptídeos na hemolinfa, tendo esses peptídeos atividade antimicrobiana de amplo espectro (HANCOCK et al., 2006; MOOKHERJEE; HANCOCK, 2007). O desafio por imersão das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em suspensão conidial de *F. oxysporum* não causou alteração na concentração de proteína total no plasma da hemolinfa em ambos os tempos de coleta, haja visto que este fungo é fitopatogênico. Por este motivo, não foi capaz de gerar a produção e/ou liberação de proteínas envolvidas na resposta imune por não conseguir realizar a penetração direta na cutícula do carrapato, que é facilitada pela produção de proteases, lipases e quitinases que atuam sobre a cutícula e que são determinantes no processo de infecção (CASTRILLO et al., 2005; LUBECK et al., 2008). O estudo das alterações provocadas pela inoculação de *F. oxysporum* na hemocele de *R. microplus* se torna interessante pois permite a avaliação da resposta de *R. microplus* à infecção por um microorganismo que naturalmente não é capaz de infectá-lo.

O aumento na concentração de proteína total 24 h após o desafio com *B. bassiana* pode ser traduzido como uma resposta imune do hospedeiro na tentativa de controlar a infecção. Esse aumento somente foi observado com 24 h; no entanto, nas primeiras 24 h de infecção, os fungos entomopatogênicos já iniciaram o processo de penetração, havendo então, a possibilidade de uma resposta imunológica do hospedeiro contra o invasor (ALVES, 1998). Nos artrópodes, a resposta imune modulada por proteínas ocorre rapidamente após o desafio. Estudos realizados por Stopforth et al. (2010) demonstraram alterações na regulação de proteínas na hemolinfa de *Ornithodoros savigny* já nas primeiras 2 h após o desafio com *C. albicans*. Vierstraete et al. (2004), utilizando a metodologia de eletroforese em gel diferencial (2D-DIGE), identificaram diferenças na expressão de proteínas, bem como proteínas distintas na hemolinfa de *D. melanogaster* 25 minutos após o desafio com *Micrococcus luteus* ou *Saccharomyces cerevisiae*. Levy et al. (2004) encontraram na hemolinfa de *Drosophila* mais de 70 proteínas, de um total de 160 proteínas, moduladas pelo menos cinco vezes, após infecção microbiana.

O processo de infecção envolve uma complexa interação entre o fungo e o artrópode hospedeiro, que pode variar de acordo com as espécies fúngicas e até mesmo com diferentes cepas de uma mesma espécie (CASTRILLO et al., 2005). A infecção de *R. microplus* por *M. anisopliae* s.l. diminuiu a concentração de proteína total na hemolinfa nos dois dias de observação. Uma possível produção de toxinas (destruxinas) por *M. anisopliae* s.l. pode ter causado imunossupressão no carrapato, que conseqüentemente não conseguiu gerar uma resposta com aumento das proteínas envolvidas na resposta imune, pois existe variação na atividade das destruxinas contra diferentes espécies de artrópodes, estando relacionada com a modulação da resposta imune celular do hospedeiro (VEY et al., 2001; VILCINSKAS et al., 1977).

Quando os fungos foram inoculados, ocorreu diminuição da concentração de proteína total no plasma com 24 h após o tratamento. A inoculação dos fungos no interior do carrapato elimina a etapa de penetração dos fungos entomopatogênicos e acelera o processo de infecção. Desta maneira, a produção de metabólitos secundários tanto por *B. bassiana* quanto por *F. oxysporum* ocorreu em um menor período de tempo. Muitos metabólitos secundários (derivados de vários intermediários no metabolismo primário) produzidos por fungos podem ser potencialmente tóxicos para artrópodes (ROHLFS; CHURCHILL, 2011), citando como exemplo as toxinas produzidas por *Beauveria* spp., conhecidas a oosporeina, beauvericina e bassianolide (CASTRILLO et al., 2005) e as destruxinas produzidas por *M. anisopliae* (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Estudos realizados por Johns et al. (1998) mostraram que a inoculação de bactérias em fêmeas de *Dermacentor variabilis* também reduziu a quantidade de proteína na hemolinfa com 24 e 48 h após o desafio, embora essa redução não tenha sido significativa provavelmente em função do elevado desvio padrão do grupo controle.

5.2.2 Quantidade de hemócitos

Os hemócitos representam um importante papel nos mecanismos de defesa de carrapatos e assim como nos insetos, a fagocitose é uma das primeiras linhas de defesa após um desafio microbiano (ZHIOUA et al., 1997). Eles fazem a retirada dos patógenos da hemolinfa através da fagocitose, nodulação, encapsulamento, além da produção e secreção de peptídeos com atividade antimicrobiana (LEVASHINA, 2004).

Os fungos entomopatogênicos causaram redução da quantidade de hemócitos na hemolinfa dos grupos tratados por imersão, porém essa redução não foi considerada significativa, em ambos os tempos de observação. No tratamento por inoculação, a quantidade de hemócitos foi reduzida pelos três fungos, podendo esta redução estar relacionada à produção de toxinas por *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana*, e/ou ao provável seqüestro das células circulantes na tentativa de controlar a infecção por *F. oxysporum* (SILVA; BITTENCOURT, 2006). Diferentemente do que foi observado por Silva e Bittencourt (2006), *M. anisopliae* s.l. reduziu significativamente a quantidade de hemócitos com 24 h após o tratamento, mantendo a imunossupressão com 48 h após a inoculação, possivelmente porque o volume do inóculo utilizado no presente trabalho foi maior. Gillespie et al. (2000) mostraram que as destruxinas produzidas como metabólitos secundários por *M. anisopliae* promovem uma aparente indução da apoptose dos hemócitos, logo o número de hemócitos circulantes é diminuído a medida que a infecção fúngica evolui, pois os metabólitos secundários são continuamente produzidos, incapacitando o sistema imune do hospedeiro.

A infecção de fêmeas de *D. variabilis* com bactérias causou aumento significativo da quantidade de hemócitos 6, 18, 24 e 48 h após a inoculação, demonstrando a habilidade desta espécie de carrapato em controlar e eliminar rapidamente as infecções causadas por *E. coli*, *M. luteus*, *Bacillus subtilis* e *S. aureus* (JOHNS et al., 1998). Neste sentido, o carrapato consegue controlar as infecções causadas por bactérias ativando a resposta imune celular, porém quando a infecção ocorre com fungos entomopatogênicos, a resposta celular não é eficiente, uma vez que há redução drástica da população de hemócitos da hemolinfa sem mecanismos compensatórios no decorrer da infecção.

A concentração de proteína total dos hemócitos nos grupos tratados com fungos está diretamente relacionada com a diminuição da população de hemócitos circulantes na hemolinfa.

5.2.3 Eletroforese e análises proteômicas

As diferentes concentrações de proteína total tanto no plasma da hemolinfa quanto nos hemócitos não alteraram o perfil eletroforético, ou seja, todas as proteínas/peptídeos presentes no grupo controle foram encontradas nos demais grupos. No entanto, as diferenças foram observadas na intensidade da expressão das proteínas no SDS-PAGE, logo, a infecção com os fungos *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* ou *F. oxysporum* alterou a expressão de proteínas constitutivas da hemolinfa e/ou dos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

No plasma da hemolinfa, as diferenças observadas na intensidade de proteínas e peptídeos foram detectadas nas bandas com peso molecular de ≈ 55 kDa e ≈ 6 kDa, respectivamente. Embora ainda não tenham sido identificadas, possivelmente as bandas com maior peso possam ser serpinas, uma vez que após o desafio microbiano em *Drosophila*, uma proteína com peso molecular de 50 kDa foi associada a uma serpina após a clivagem por proteases ativas (LEVASHINA et al., 1999). Além disso, no presente estudo, uma banda com peso molecular próximo de 55 kDa foi identificada nos hemócitos como sendo uma serpina.

Muitas serino-proteases e seus inibidores (Serpinas) têm um papel central na resposta imune de invertebrados, incluindo a coagulação da hemolinfa, melanização e indução de genes de peptídeos antimicrobianos (KANOST, 1999; JIANG; KANOST, 2000), sendo os carrapatos considerados ricas fontes de serpinas, principalmente pertencentes à família Kunitz-BPTI (LIMA et al., 2009). Nesse sentido, foi observado que nos grupos em que ocorreu o desafio microbiano a intensidade dessas proteínas (possivelmente serpinas) aumentou quando comparada com o grupo controle, em ambos os tempos de observação. O aumento na intensidade destas bandas ocorreu 24 h após o tratamento, nos grupos PICADO e H₂O; no entanto, 48 h após o tratamento a intensidade destas bandas diminuiu, uma vez que não havia mais estímulo para manter a resposta imune.

O gel SDS-PAGE 1D dos hemócitos demonstrou alterações na expressão de determinadas proteínas, identificadas como vitelogenina (com seqüência homóloga a dos carrapatos *D. variabilis* e *R. microplus*), HeLp, hemoglobina bovina e serpinas. Ainda foram identificadas queratina, miosina e actina que embora tenha havido todos os cuidados necessários para evitar uma possível contaminação durante o processo de confecção do gel, estavam presentes no gel. A vitelogenina e a HeLp foram identificadas provavelmente em função da contaminação dos hemócitos com o plasma da hemolinfa, embora o pellet tenha sido lavado com tampão fosfato pH 7,2 antes da sua resuspensão no tampão e posterior utilização na eletroforese. Sonenshine (1991) ao demonstrar o perfil eletroforético das proteínas encontradas nos hemócitos de *D. variabilis* identificou as duas proteínas, porém esse achado não foi discutido pelo autor. A hemoglobina bovina também pode ser considerada contaminante da hemolinfa durante o processo de coleta, tendo se misturado aos hemócitos na etapa de centrifugação para separação da hemolinfa total.

Nos hemócitos, as alterações encontradas na intensidade da expressão das serpinas entre os grupos estudados demonstra que há modulação da resposta imune de *R. microplus* pelos fungos. Diferentemente do que foi observado no plasma da hemolinfa, nos hemócitos dos grupos inoculados com os fungos houve uma menor intensidade da expressão de serpinas. Uma menor quantidade de hemócitos também foi observada nestes grupos quando comparado com o controle (H₂O 24). A infecção de *B. bassiana* pela cutícula de *R. microplus* também reduziu a expressão das serpinas-3 quando comparado com o controle, no entanto, não houve diferença na quantidade de hemócitos entre esses grupos. Estudos da via Toll de *Drosophila* mostram que pelo menos algumas serino proteases e serpinas são moléculas de sinalização extracelular (LEVASHINA et al., 1999), logo a menor intensidade da expressão das serpinas pode não estar relacionada com a quantidade de hemócitos. Portanto, *B. bassiana* e *M. anisopliae* conseguem neutralizar o sistema imunológico de hospedeiros artrópodes

provavelmente através da inibição da expressão de genes, tais como serpinas. Essa inibição pode estar relacionada com a produção de metabólitos intermediários por estes fungos (GILLESPIE et al., 2000).

No presente estudo, muitas sequências de peptídeos obtidas da eletroforese dos hemócitos ficaram sem identificação, uma vez que o genoma de *R. microplus* ainda não está definido.

Estudos realizados com *Drosophila* sp. mostraram que a indução dos genes de serino-proteases depende do tipo de patógeno e da via de infecção: os genes de serino-proteases induzidos na infecção por vírus, bactéria e protozoário foram reprimidos na infecção natural por *B. bassiana*, enquanto que alguns genes de serpinas foram induzidos na infecção por *Beauveria* (ROXSTROM-LINDQUIST et al., 2004). De Gregorio et al. (2001) mostraram que a expressão dos genes de um conjunto de serpinas foi induzida com a infecção por *B. bassiana* enquanto outro conjunto de genes foi reprimido. No presente trabalho, provavelmente um conjunto de genes de serpinas foi suprimido nos hemócitos de *R. microplus* enquanto outro conjunto de genes foi super expresso no plasma da hemolinfa após infecção por *B. bassiana* e *M. anisopliae*, uma vez que sua intensidade foi reduzida nos hemócitos e aumentada no plasma da hemolinfa após análise do SDS-PAGE.

A presença de inibidores de proteases poderia bloquear a invasão e proliferação de agentes patogênicos que usam proteinases para a invasão dos tecidos do hospedeiro, aquisição de nutrientes e/ou a evasão do sistema imune do hospedeiro (ARMSTRONG, 2001). Logo, a supressão desses serpinas permitiria a atividade das proteases fúngicas relacionadas com o processo patogênico desses entomopatógenos, tornando a infecção bem sucedida. No entanto, a afirmação da supressão das serpinas só poderia ser feita com estudos de expressão gênica, que não foi o objetivo do presente trabalho.

A outra banda que demonstrou alteração de intensidade no plasma da hemolinfa apresenta peso molecular entre 6 kDa e 19 kDa. Este peptídeo já está sequenciado, porém ainda não foi identificado. Defensinas com atividade antimicrobiana, apresentando peso molecular de 5 kDa e 6 kDa, foram identificados na hemolinfa do carrapato *D. variabilis* após o desafio com *B. subtilis* (JOHNS et al., 2001b). Logo, existe a probabilidade desta banda ser uma defensina constitutiva do plasma de *R. microplus*, que teve sua expressão aumentada após a infecção por *M. anisopliae*, *B. bassiana* ou *F. oxysporum*.

A resposta imune envolvendo proteínas de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* quando desafiadas com fungos não pode ser avaliada unicamente pela técnica de eletroforese, havendo a necessidade da utilização de estudos proteômicos, com conseqüente separação das proteínas pela técnica de eletroforese bidimensional seguida pela identificação por espectrometria de massas. O presente estudo evidenciou, através do 2D PAGE, que a infecção com *B. bassiana* ou *F. oxysporum* altera o proteoma da hemolinfa de *R. microplus* induzindo ou inibindo a expressão de algumas proteínas. Todos os spots desse 2D-PAGE foram excisados e analisados por Maldi-Tof-Tof, no entanto a identificação destas proteínas ainda não foi realizada. O proteoma de *R. microplus* vem sendo explorado recentemente por alguns autores (KONGSUWAN et al., 2010; RACHINSKY et al., 2008; UNTALAN et al., 2005). No entanto, não há estudos do proteoma da hemolinfa desta espécie de carrapato após o desafio com fungos entomopatogênicos.

A partir destas identificações e conseqüente obtenção do proteoma da hemolinfa de *R. microplus*, espera-se contribuir para um melhor entendimento da resposta imune do carrapato quando desafiado com fungos entomopatogênicos (*B. bassiana*) e com *F. oxysporum* (fitopatogênico). O entendimento desses mecanismos de defesa é essencial para o desenvolvimento de melhores estratégias para controlar carrapatos bem como prevenir a transmissão de patógenos por este parasito.

5.2.4 Cromatografia (CLAE) e atividade antimicrobiana do plasma da hemolinfa

O plasma da hemolinfa filtrada em membranas de 100 kDa foi analisado em CLAE na coluna C18 apenas para obtenção de um perfil geral da hemolinfa, que também foi obtido com SDS-PAGE 1D. Maior ênfase foi dada ao plasma da hemolinfa filtrada em membrana de 10 kDa para identificação de possíveis peptídeos antimicrobianos produzidos por *R. microplus* após desafio fúngico.

A resposta imune desenvolvida por *R. microplus* infectados por *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* ou *F. oxysporum* também foi avaliada pela produção e/ou liberação de peptídeos na hemolinfa observados pela técnica de CLAE e identificados por espectrometria de massas. A atividade antimicrobiana do plasma da hemolinfa dos diferentes grupos foi avaliada contra o próprio fungo utilizado como tratamento e contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Apenas o grupo desafiado com *B. bassiana*, cuja hemolinfa foi coletada 48 h após o tratamento por imersão, apresentou atividade antimicrobiana contra *B. bassiana*, porém não inibiu o crescimento bacteriano. No entanto, outras espécies de bactérias deveriam ter sido testadas para que pudéssemos afirmar que essa atividade antimicrobiana foi específica, pois estudos realizados com *R. microplus* não-sensibilizados demonstraram que o plasma da hemolinfa, bem como o conteúdo do intestino, não apresentam atividade contra bactérias gram-negativas (FOGAÇA et al., 1999; FOGAÇA et al., 2004). Essa atividade foi observada somente nos hemócitos, através da identificação do PAM denominado ixodidina, que foi capaz de inibir 20% do crescimento de *E. coli* (FOGAÇA et al., 2006). Em outra espécie de carrapato, a hemolinfa de fêmeas não-sensibilizadas de *D. variabilis* inibiu o crescimento de *B. subtilis* (10 mm) e *M. luteus* (15 mm) (JOHNS et al., 1998), contudo, corroborando os resultados obtidos no presente estudo, não apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli*.

Fehlbaum et al. (1994) identificaram um peptídeo (drosomicina) em *Drosophila* com potente atividade antifúngica após o desafio com uma combinação de bactérias gram-positivas e gram-negativas, provavelmente em função da expressão de alguns genes de PAMs ser regulada pela via Toll, que é ativada tanto por fungos quanto por bactérias gram-positivas (LEMAITRE et al., 1997; HOFFMANN, 2003). A infecção natural de *B. bassiana* em *Drosophila* induziu uma resposta antifúngica específica, porém mais lenta do que uma infecção induzida por bactérias, que foi iniciada 12 a 24 h após a infecção (LEMAITRE et al., 1997). Muitos estudos relacionados com a resposta imune após a infecção natural ou não com o fungo entomopatogênico *B. bassiana* estão sendo desenvolvidos no inseto modelo *D. melanogaster*, porém este é o primeiro estudo realizado neste sentido com o carrapato *R. microplus*.

Após passagem desta hemolinfa com atividade antimicrobiana na coluna Superose e depois na FR-C18, as frações coletadas desta segunda passagem em CLAE apresentaram atividade anti-*B. bassiana*, porém nenhuma fração teve atividade anti-*C. albicans*. A microplusina, PAM com massa molecular de 10.204 Da identificado na hemolinfa livre de células de fêmeas não-sensibilizadas de *R. microplus*, não demonstrou atividade contra *C. albicans* e *E. coli*, apenas contra *M. luteus* (FOGAÇA et al., 2004). A maioria das frações que exibiram atividade antimicrobiana neste estudo apresentou em comum um íon com razão m/z de 1.119,5, sugerindo que o PAM observado seja um novo peptídeo identificado no plasma da hemolinfa desta espécie de carrapato, e que somente é induzido pela infecção com o fungo *B. bassiana*. No entanto, outros íons podem estar envolvidos com essa atividade antimicrobiana, já que algumas frações com atividade antimicrobiana não apresentaram o íon com essa m/z. Estudos serão conduzidos objetivando a purificação e conseqüente identificação deste peptídeo.

Os peptídeos antimicrobianos de carrapatos mostram algumas características únicas como expressão constitutiva e seqüência única, que podem fazer deles bons candidatos para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas (TAYLOR et al., 2006).

5.3 Perfil Lipídico

5.3.1 Hemolinfa (plasma/hemócitos)

No presente trabalho, outro foco foi dado aos lipídeos de *R. microplus*, tanto na hemolinfa quanto no corpo gorduroso. Os lipídeos são extremamente relevantes, pois estão envolvidos na biogênese de membranas nos locais de infecção ou nos hemócitos e são utilizados como fonte de energia (ARRESE; SOULANGES, 2010). Os lipídeos encontrados na hemolinfa de carrapatos incluem as mesmas classes comumente encontradas em todos os tecidos de animais, como fosfolipídeos, esteróis, acilgliceróis e ácidos graxos livres que, na hemolinfa de carrapatos, tendem a refletir a composição de ácidos graxos do plasma do hospedeiro no qual os carrapatos se alimentaram (SONENSHINE, 1991). Em geral, a variação de lipídeos encontrada na hemolinfa de artrópodes relaciona-se ao estado fisiológico (STEELE, 1985) e à resposta a um desafio imunológico (CHEON et al., 2006). No presente estudo, as alterações observadas tanto na hemolinfa quanto no corpo gorduroso de *R. microplus* podem ser atribuídas à resposta imunológica, pois os carrapatos se alimentaram em um único hospedeiro (ou seja, mesma fonte nutricional) e encontravam-se no mesmo estágio de desenvolvimento, além dos grupos terem sido homogeneizados quanto ao peso.

No plasma da hemolinfa foram identificadas as classes de lipídeos neutros CHO, com maior abundância, e AG. Maya-Monteiro et al. (2000) descreveram a composição da principal proteína na hemolinfa de *R. microplus*, a HeLp. Essa proteína apresenta 33% de lipídeos (fosfolipídeos e lipídeos neutros), e entre os lipídeos neutros, o mais abundante é o CHOE (34,7%), seguido pelo CHO (11,7%), AG (7,7%) e TG (1%). No presente trabalho, as classes de lipídeos neutros foram representadas por uma proporção semelhante, com exceção do TG, que não foi identificado em todas as cromatografias realizadas, talvez por representar um menor percentual dos lipídeos no plasma da hemolinfa, como demonstrado por Maya-Monteiro et al. (2000). Por este motivo, a classe de TG não foi submetida à análise densitométrica, embora a figura 48 tenha mostrado uma nuance de TG nas amostras. A inoculação com os fungos causou aumento no percentual de CHOE no plasma da hemolinfa, embora a intensidade da HeLp no SDS-PAGE 10% (Figura 15) pareça estar maior neste grupo que no grupo controle (H₂O). No entanto, a redução de AG foi observada após inoculação com *M. anisopliae* s.l., indicando que a infecção fúngica altera o metabolismo lipídico de *R. microplus*.

Em relação aos fosfolipídeos, HeLp apresentou 29,4% de PC e 14,3% de PE (MAYA-MONTEIRO et al., 2000). No presente estudo, a classe de PE não foi identificada, no entanto, foi identificado outro fosfolipídeo, o PI. Embora a espécie de carrapato seja a mesma em ambos os estudos, trata-se de distintas populações de carrapatos, fato que possivelmente pode ter sido determinante na diferença de classes de lipídeos encontradas na hemolinfa de *R. microplus*. As diferentes origens dos carrapatos (sul x sudeste do Brasil) e a distinta dieta alimentar dos seus hospedeiros podem ter refletido na composição de fosfolipídeos na hemolinfa de *R. microplus*, já que, segundo Sonenshine (1991), lipídeos da hemolinfa de carrapatos refletem a composição do plasma do hospedeiro no qual se alimentaram.

5.3.2 Corpo gorduroso

As infecções parasitárias apresentam uma demanda adicional pelos recursos do hospedeiro, quer seja pela competição direta por energia (COOP; HOLMES, 1996) ou pelo estímulo do sistema imunológico do hospedeiro (MORET; SCHMIDT-HEMPEL, 2000). No molusco *Biomphalaria glabrata*, a quantidade de TG no complexo glândula digestiva gônada aumentou na infecção por *Schistosoma mansoni* (THOMPSON et al., 1987) e reduziu na infecção com *Echinostoma caproni* quando comparadas com o grupo não infectado (BANDSTRA et al., 2006). Esse complexo é considerado o principal centro metabólico nesses organismos, onde se localizam os principais centros enzimáticos relacionados especialmente as reações anabólicas e também catabólicas. Por conseqüência, apresenta uma circulação hemolinfática diferenciada possibilitando um maior fluxo de nutrientes, o que o torna também o principal órgão de reserva de macromoléculas como glicogênio, lipídeos, galactogênio, entre outros, podendo ser então grosseiramente comparado com o corpo gorduroso. Da mesma maneira, as infecções por *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* ora causaram aumento das classes de lipídeos neutros ou fosfolipídeos estudadas, ora causaram redução destes lipídeos na hemolinfa de *R. microplus* em detrimento da virulência de cada fungo.

No corpo gorduroso do carrapato *R. microplus*, foi observado aumento significativo na quantidade de TG 48 h após a inoculação de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana*. Portanto, o aumento na quantidade de TG provavelmente ocorreu devido às alterações do metabolismo causadas pela infecção dos entomopatógenos, gerando o acúmulo de TG neste tecido. A atividade lipásica neste tecido de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* diminuiu nas primeiras 24 h após a infecção, porém aumentou com 48 h após a infecção, principalmente na infecção causada por *M. anisopliae* s.l.. O aumento observado nos grupos controle negativo e positivo (48 h) foi semelhante, o que significa que a inoculação do veículo utilizado na suspensão conidial dos fungos não interferiu na atividade lipásica do corpo gorduroso e que o aumento da atividade lipásica no corpo gorduroso dos grupos inoculados com os fungos deve-se à alteração no metabolismo do carrapato provavelmente para tentar controlar a infecção. Paralelamente à elevada atividade lipásica no grupo inoculado com *M. anisopliae* s.l. (Ma INO 48) foi observado grande quantidade de TG. Para tanto, supõe-se que o carrapato tenha armazenado grande quantidade de TG como combustível energético para tentar controlar a infecção causada pelo fungo, concomitantemente, a atividade lipásica tende a aumentar para que ocorra a hidrólise de TG e posterior liberação de diacilglicerol na hemolinfa para produção de energia (ATHENSTAEDT; DAUM, 2006).

Na abelha *Pachnoda sinuata*, a injeção de análogos de AMPc, um segundo mensageiro envolvido em processos fisiológicos, acarretou na ativação da lipase TG e estimulou a síntese de prolina (AUERSWALD et al., 2005), bem como a injeção de peptídeos adipocinéticos aumentaram a atividade da lipase TG no corpo gorduroso de *Holopterna alata* (GÄDE et al., 2006). Em adipócitos de vertebrados, a perilipina, que é uma proteína reguladora da lipólise, pode impedir ou estimular a hidrólise de triglicerídeos dependendo do seu nível de fosforilação (BRASAEMLE, 2007). Manzano-Roman et al. (2008) estudando o envolvimento da perilipina nas infecções de células HL-60 de humanos por *Anaplasma phagocytophilum* sugeriram que a perilipina não é induzida nestas células como um mecanismo de defesa para limitar a multiplicação do patógeno, mas *A. phagocytophilum* modula o metabolismo lipídico aumentando a expressão de perilipina para facilitar a infecção na célula hospedeira. Da mesma maneira, *M. anisopliae* s.l. poderia estar modulando a expressão de proteínas envolvidas com a lipólise ou estimulando a fosforilação dessas proteínas, aumentando assim a atividade lipolítica no corpo gorduroso de *R. microplus*.

Estudos relacionados com a fosforilação de proteínas no corpo gorduroso estão sendo realizados por nosso grupo de pesquisa para o maior esclarecimento do metabolismo no corpo gorduroso do carrapato *R. microplus* infectado com fungos entomopatogênicos, que acarreta o acúmulo de TG e ao mesmo tempo em que há aumento da atividade lipásica.

A lipólise nos insetos é induzida pelo hormônio AKH e ativa o Inositol-3-fosfato (STAUBLI et al., 2002). No carrapato *R. microplus*, os fungos *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* alteram o metabolismo lipídico, pois o aumento de fosfatidilinositol (PI) foi observado na hemolinfa 48 h após inoculação dos fungos, o que sugere a ocorrência da lipólise. Além disto, a atividade lipásica está aumentada no corpo gorduroso; possivelmente a infecção fúngica não está permitindo a utilização de TG como fonte de energia, pois ele se mantém elevado no CG. Desta maneira, as alterações provocadas em *R. microplus* por *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* levaram ao acúmulo de TG no corpo gorduroso, provavelmente por impedir e/ou retardar o processo de oxidação necessário para sua utilização pelo organismo de *R. microplus*.

A utilização dos lipídeos pelos insetos, e o metabolismo lipídico de um modo geral, têm sido revisados por muitos autores (ARRESE; SAULAGES, 2010; ATHENSTAEDT; DAUM, 2006; CHEON et al., 2006; GÄDE et al., 2006), mas essas informações ainda são escassas para carrapatos. Maiores estudos são necessários para uma melhor compreensão do metabolismo de *R. microplus* e de sua resposta imune após a infecção com fungos. Desta maneira, poderíamos determinar possíveis alvos para o controle deste importante parasito.

6 CONCLUSÕES

A infecção por *Metarhizium anisopliae* s.l., *Beauveria bassiana* ou *Fusarium oxysporum* altera o perfil protéico na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, induzindo a expressão/supressão de determinadas proteínas.

A infecção por *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* modula a resposta celular de *R. microplus* causando imunossupressão dos hemócitos.

Fusarium oxysporum apresenta potencial patogênico quando inoculado na hemocele de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Metarhizium anisopliae s.l., *B. bassiana* e *F. oxysporum* modulam a expressão de serpinas nos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

O carrapato *R. microplus* produz peptídeos com atividade antimicrobiana após desafio com *B. bassiana*, e provavelmente essa atividade está relacionada ao íon m/z de 1.119,5.

Os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* alteram o metabolismo lipídico de *R. microplus*, principalmente as reservas de triacilglicerol presentes no corpo gorduroso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2^a ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- ANGELO, I.C. Avaliação *in vitro* dos efeitos de *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinus* e *Lecanicillium lecanii* sobre *Boophilus microplus*. Dissertação de Mestrado. 37p, 2007.
- ANGELO, I.C.; FERNANDES, E.K.K.; BAHIENSE, T.C.; PERINOTTO, W.M.S.; MORAES, A.P.R.; TERRA, A.L.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.172, p.317-322, 2010.
- ARMSTRONG, P.B. The contribution of proteinase inhibitors to immune defense. **Trends in Immunology**, v.22, p.47-52, 2001.
- ARRESE, E.L.; HOWARD, A.D.; PATEL, R.T.; RIMOLDI, O.J.; SOULAGES, J.L. Mobilization of lipid stores in *Manduca sexta*: cDNA cloning and developmental expression of fat body triglyceride lipase, TGL. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.40, p.91-99, 2010.
- ARRESE, E.L.; SOULAGES, J.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, v.55, p.207-225, 2010.
- ASO, Y.; YAMASHITA, T.; MENO, K.; MURAKAMI, M. Inhibition of prophenoloxidase-activating enzyme from *Bombyx mori* by endogenous chymotrypsin inhibitors. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.33, p.751-758, 1994.
- ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.63, p.1355-1369, 2006
- AUERSWALD, L.; SIEGERT, K.J.; GÄDE, G. Activation of triacylglycerol lipase in the fat body of a beetle by adipokinetic hormone. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, p.461-470, 2005.
- AZZOLINI, S.S.; SANTOS, J.M.C.; SOUZA, A.F.; TORQUATO, R.J.S.; HIRATA, I.Y.; ANDREOTTI, R.; TANAKA, A.S. Purification, characterization, and cloning of a serine proteinase inhibitor from the ectoparasite *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). **Experimental Parasitology**, v.106, n.3-4, p.103-109, 2004.
- BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; LORGERIL, J.; GARNIER, J.; ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v.198, p.149-168, 2004.
- BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, É. K. K.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S. and BITTENCOURT, V. R. E. P. Performance of *Metarhizium anisopliae* and its combination with deltamethrin against a pyrethroid-resistant strain of *Boophilus microplus* in a stall test. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1149, p.242-245, 2008.
- BALASHOV, Yu.S. 1983. **An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure**. In: Raikhel, A.S., Hoogstral, I.L. (Ed.), Springer, Lanham.

- BANDSTRA, S.R.; FRIED, B.; SHERMA, J. High-performance thin-layer chromatographic analysis of neutral lipids and phospholipids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Echinostoma caproni*. **Parasitology Research**, v.99, p.414–418, 2006.
- BARBAULT, F.; LANDON, C.; GUENNEUGUES, M.; MEYER, J.P.; SCHOTT, V.; DIMARCQ, J.L.; VOVELLE, F. Solution structure of Alo-3: a new knottin-type antifungal peptide from the insect *Acrocinus longimanus*. **Biochemistry**, v.42, p.14434-14442, 2003.
- BARROS, T.A.M.; EVANS, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infectantes do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.9, p.17-21, 1989.
- BEENAKKERS, A.M.T.; VAN DER HORST, D.J.; VANMARREWIJK, W.J.A. Insect flight metabolism. **Insect Biochemistry**, v.14, p.243-260, 1984.
- BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.2, 133-153, 2000.
- BIDOCHKA, M.J.; SMALL, C.L.; SPIRONELLO, M. Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Environmental Microbiology**, v.7, p.1361-1368, 2005.
- BINNINGTON, K.C; OBENCHAIN, F.D. **Structure and function of the circulatory, nervous, and neuroendocrine systems of ticks**. In: Obenchain, F.D. and Galun R. (Eds) Physiology of Ticks. Pergamon Press, Oxford, 1982.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. **Mycologia**, v.98, p.737-745, 2006.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v.101, p.512-530, 2009.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p.351-354, 1999.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida**, v.17, p.83-88, 1995.
- BRASAEMLE, D.L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. **Journal of Lipid Research**, v.48, p.2547-2559, 2007.
- BRAZ, G.R.C.; COELHO, H.S.L.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Current Biology**, v.9, n.13, p.703-706, 1999.
- BROWNBRIDGE, M.; COSTA, S.; JARONSKI, S.T. Effects of *in vitro* passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.77, p.280-283, 2001.
- BULET, P.; CHARLET, M.; HETRU, C. In Innate Immunity, (Ezekowitz, R.A.B. and Hoffmann, J.A., Eds.) pp. 89-107. Humana Press, Totowa, NJ. 2003.
- BULET, P.; HETRU, C.; DIMARQ, J.L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology**, v.23, p.329–344, 1999.

- BULET, P.; STOCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structure, properties and gene regulation. **Protein and Peptide Letters**, v.12, p.3-11, 2005.
- CABRAL, G.A. Lipids as bioeffectors in the immune system. **Life Sciences**, v.77, p.1699–1710, 2005.
- CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z.E.; KARNAS, K.J. PENNINGTON, J.E.; WELLS, M.A. Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition**, v.21, p.23-46, 2001.
- CASTRILLO, L.A.; ROBERTS, D.W.; VANDENBERG, J.D. The fungal past, present, and future: germination, ramification, and reproduction. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.89, p.46-56, 2005.
- CASTRO-OCHOA, L.D.; RODRIGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.648-654, 2005.
- CERAUL, S.M.; DREHER-LESNICK, S.M.; GILLESPIE, J.J.; RAHMAN, M.S.; AZAD, A.F. New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. **Infection and Immunity**, v.75, p.1973–1983, 2007.
- CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of acari. **Biocontrol Science and Technology**, v.10, p.357-384, 2000.
- CHENG, T.C.; RODRICH, G.E.; FOLEY, D.A.; KOEHLER, S.A. Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.25, p.261-265, 1979.
- CHEON, H.M.; SHIN, S.W.; BIAN, G.; PARK, J.H.; RAIKHEL, A.S. Regulation of lipid metabolism genes, lipid carrier protein lipophorin, and its receptor during immune challenge in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, p.8426-8435, 2006.
- CHINZEI, Y.; CHINO, H.; TAKAHASHI, K. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from a tick, *Ornithodoros moubata*. **Journal of Comparative Physiology**, v.152B, p.13-21, 1983.
- CHOI, S.; HWANG, J.M.; KIM, S.I. A Colorimetric Microplate Assay Method for High Throughput Analysis of Lipase Activity. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.36, p.417-420, 2003.
- CLARKSON, J.M.; CHARNLEY, A.K. New insights into mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends Microbiology**, v.4, n.5, p.197-203, 1996.
- COCIANCICH, S.; BULET, P.; HETRU, C.; HOFFMAN, J.A. The inducible antibacterial peptides of insects. **Parasitology Today**, v.10, p.132-138, 1994.
- COOP, R.L.; HOLMES, P.H. Nutrition and parasite interactions. **International Journal for Parasitology**, v.26, p.951-962, 1996.
- CRUZ, C.E.; FOGAÇA, A.C.; NAKAYASU, E.S.; ANGELI, C.B.; BELMONTE, R.; ALMEIDA, I.C.; MIRANDA, A.; MIRANDA, M.T.M.; TANAKA, A.S.; BRAZ, G.R.; CRAIK, C.S.; SCHNEIDER, E.; CAFFREY, C.R.; DAFFRE, S. Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. **Parasites and Vectors**, v.3, n.63, 2010.
- DA-SILVA VAZ, I.; MARTINEZ, R.H.M.; OLIVEIRA, A.; HECK, A.; LOGULLO, C.; GONZALES, J.C.; DEWES, H.; MASUDA A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. **Veterinary Parasitology**, 62, 155-160, 1996.

- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.121, p.404-27, 1964.
- DE FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v.43, p.237-256, 2007.
- DE GREGORIO, E.; SPELLMAN, P.T.; RUBIN, G.M.; LEMAITRE, B. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v.98, p.12590-12595, 2001.
- DENARDI, S.E., BECHARA, G.H., CAMARGO-MATHIAS, M.I. New morphological data on fat bodies of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Micron**, v.36, n.7, p.875-883, 2008.
- DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Fat body cells of *Amblyomma cajennense* partially engorged females (Acari: Ixodidae) and their role on vitellogenesis process. **Experimental Parasitology**, v.121, p.213–218, 2009.
- DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; OLIVEIRA, P.R.; NUNES, E.T.; SAITO, K.C.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.125, p.379–395, 2004.
- DUMAS, C.; MATHA, V.; QUIOT, J.M.; VEY, A. Effects of destruxins, cyclic depsipeptide mycotoxins, on calcium balance and phosphorylation of intracellular proteins in lepidopteran cell lines. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology and Pharmacology**, v.114, p.213–219, 1996.
- EGGENBERGER, L.R.; LAMORREAUX, W.J.; COONS, L.B. Hemocytic encapsulation of implants in the tick, *Dermacentor variabilis*. **Experimental and Applied Acarology**, v.9, p.279-287, 1990.
- ELEFThERIANOS, I.; MAROKHAZI, J.; MILLICHAP, P.J.; HODGKINSON, A.J.; SRIBOONLERT, A.; FFRENCH-CONSTANT, R.H.; REYNOLDS, S.E. Prior infection of *Manduca sexta* with non-pathogenic *Escherichia coli* elicits immunity to pathogenic *Photorhabdus luminescens*: roles of immune-related proteins shown by RNA interference. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.36, n.6, p.517–525, 2006.
- ESTEVEES, E.; FOGAÇA, A.C.; MALDONADO, R.; SILVA, F.D; MANSO, P.P.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Development and Comparative Immunology**, v.33, n.8, p.913-919, 2009.
- FAHMY, A.S.; ABDEL-GANY, S.S.; MOHAMED, T.M.; MOHAMED, S.A. Esterase and lipase in camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) during embryogenesis **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.137, p.159–168, 2004.
- FARGUES, J.; GOETEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia**, v.135, p.171–181, 1996.
- FARGUES, J.F.; ROBERT, P.H. Effects of passing through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.576-583, 1983.

- FEHLBAUM, P.; BULET, P.; MICHAUT, L.; LAGUEUX, M.; BROEKAERT, W. F.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.A. Insect Immunity: Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.52, p.3359-63, 1994.
- FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v.46. p.71-93, 2008.
- FERNANDES, É.K.K.; COSTA, G.L.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus*. **Journal of Basic Microbiology**, v.44, p.270-274, 2004.
- FERNANDES, É.K.K.; KEYSER, C.A.; CHONG, J.P.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, M.P.; ROBERTS, D.W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p.115-128, 2010.
- FERRON, P.; FARGUES, J.; RIBA, G. **Fungi as microbial insecticides against pests**. In: Adora D.K., Ajello L. e Mujerrji K.G. Handbook of Applied Mycology. New York: Marcel Dekker. 1991.
- FOGAÇA, A.C.; ALMEIDA, I.C.; EBERLIN, M.N.; TANAKA, A.S.; BULET, P.; DAFFRE. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, v.27, p.667-674, 2006.
- FOGAÇA, A.C.; LORENZINI, D.M.; KAKU, L.M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental and Comparative Immunology**, v.28, p.191-200, 2004.
- FOGAÇA, A.C.; SILVA JR, P.I.; MIRANDA, M.T.M.; BIANCHI, A.G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P.E.M.; DAFFRE, S. Antimicrobial Activity of a Bovine Hemoglobin Fragment in the Tick *Boophilus microplus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.36, 1999.
- FRAZZON, A.P.G.; JUNIOR, I.S.V.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.94, p.117-125, 2000.
- FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola Veterinária UFMG**, n.8, p.49-61, 1993.
- FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, ano 23, n.137, 2004.
- GÄDE, G.; AUERSWALD, L.; MARCO, H.G. Flight fuel and neuropeptidergic control of fuel mobilisation in the twig wilter, *Holopterna alata* (Hemiptera, Coreidae). **Journal of Insect Physiology**, v.52, p.1171-81, 2006.
- GAMS, W.; ROZSYPAL, J. *Metarhizium flavoviride* n. sp. isolated from insects and soil. **Acta Botanica Neerlandica**, v.2, p.518-521, 1973.
- GILBERT, L.I.; CHINO, H. Transport of lipids in insects. **Journal of Lipid Research**, v.15, p.439-456, 1974.
- GILLESPIE, J.P.; KANOST, M.R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, v.42, p.611-643, 1997.

- GINDIN, G.; SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. The Susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) Ticks to Entomopathogenic Fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p.111-118, 2001.
- GOBERT, V.; GOTTAR, M.; MATSKEVICH, A.A.; RUTSCHMANN, S.; ROYET, J.; BELVIN, M.; HOFFMANN, J.A.; FERRANDON, D. Dual activation of the *Drosophila* Toll pathway by two pattern recognition receptors. **Science**, v.302, p.2126-2130, 2003.
- GOLODNE, D.M.; MONTEIRO, R.Q.; GRAÇA-SOUZA, A.V.; SILVA-NETO, M.A.C.; ATELLA, G.C. Lysophosphatidylcholine acts as an anti-hemostatic molecule in the saliva of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.30, p.2766-2771, 2003.
- GONDIM, K.C.; OLIVEIRA, P.L.; COELHO, H.S.L.; MASUDA, H. Lipophorin from *Rhodnius prolixus*: purification and partial characterization. **Insect Biochemistry**, v.19, p.153-161, 1989.
- GONZALES, J. C. **O controle do carrapato dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 103p.
- GONZALES, J.C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 101p.
- GONZÁLES, J.C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Can. 1887) (Revisão histórica e conceitual). **A Hora Veterinária**, ano 21, n.125, p.23-28, 2002
- GORMAN, M.J.; PASKEWITZ, S.M. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.257-62, 2001.
- GOTTAR, M.; GOBERT, V.; MATSKEVICH, A.; REICHHART, J.M.; WANG, C.; BUTT, T.M.; BELVIN, M.; HOFFMANN, J.A.; FERRANDON, D. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* by recognition of glucans and sensing of virulence factors. **Cell**, v.127, p.1425-1437, 2006.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; BORJA, G.E.M.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, ano 21, n.125, p.23-28, 2002.
- GRUBHOFFER, L.; VERES, J.; DUSBABEK, F. **Lectins as the molecular factors of recognition and defense reactions of ticks**. In: Dusbabek, F., Bukva, V. (Eds.), *Modern Acarology*, 2. Academia, Prag, p.381-388, 1991.
- GUDDERRA, N.P.; NEESE, P.A.; SONENSHINE, D.E.; APPERSON, C.S.; ROE, R.M. Developmental profile, isolation, and biochemical characterization of a novel lipoglycopheme-carrier protein from the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae) and observations on a similar protein in the soft tick, *Ornithodoros parkeri* (Acari:Argasidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.299-311, 2001.
- GUDDERRA, N.P.; SONENSHINE, D.E.; APPERSON, C.S.; ROE, R.M. Hemolymph proteins in ticks. **Journal of Insect Physiology**, v.48, p.269-278, 2002a.
- GUDDERRA, N.P.; SONENSHINE, D.E.; APPERSON, C.S.; ROE, R.M. Tissue distribution and characterization of predominant hemolymph carrier proteins from *Dermacentor variabilis* and *Ornithodoros parkeri*. **Journal of Insect Physiology**, v.48, p.19-29, 2002b.
- GUIMARÃES, A.M.; LIMA, J.D.; RIBEIRO, M.F.B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v.84, p.323-327, 1998

- HANCOCK, R.E.W.; BROWN, K.L.; MOOKHERJEE, N. Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. **Immunobiology**, v.211, p.315-322, 2006.
- HANCOCK, R.E.W.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.82–88, 1998.
- HANCOCK, R.E.W.; SCOTT, M.G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, p.8856-8861, 2000.
- HAWKSWORTH, D.L. **Micologist's handbook**. 2^aed. England, Kew Surrey: CAB Press, 1977. 231p
- HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. (Ainsworth and Bisby's) **Dictionary of the Fungi**, 8^aed. , CAB International, Wallingford, UK, 616p., 1995.
- HETRU, C.; HOFFMAN, D.; BULET, P. **Antimicrobial peptides from insects**. In: Brey, P.T., Hultmark, D. (Eds.), *Molecular mechanisms of immune responses in insects*. Chapman and Hall, New York, 1998.
- HEUCHERT, C.M.; DE, G.V.JR.; DE ATHAIDE, D.F.; BOSE, R.; FRIEDHOFF, K.T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.1-11, 1999.
- HOFFMANN, J.A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, v.426, p.33-38, 2003.
- HOFFMANN, J.A.; KATATOS, F.C.; JANEWAY, C.A.JR.; EZEKOWITZ, R.A.B. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v.284, p.1313-1318, 1999.
- HOFFMANN, J.A.; REICHHART, J.M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. **Nature Immunology**, v.3, n.2, 2002.
- HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.4, p.12-32, 1985.
- HORWITZ, J.; PERLMAN, R.L. Measurement of inositol phospholipid-metabolism in PC12 pheochromocytoma cells. **Methods in Enzymology**, v.141, p.169-175, 1987.
- HU, Q.B.; REN, S.X.; WU, J.H.; CHANG, J.M.; MUSA, P.D. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. **Toxicon**, v.48, p.491-498, 2006.
- HUNT, D.W.A. Absence of fatty acid germination inhibitors for conidia of *Beauveria bassiana* on the integument of the bark beetle *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). **The Canadian Entomologist**, v.118, p.837-838, 1986.
- IWANAGA S. The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. **Current Opinion in Immunology**, v.14, p.87–95, 2002.
- IWANAGA, S.; LEE, B.L. Recent advances in the innate immunity of invertebrates animals. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, p.128-150, 2005.
- JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.390–397, 2002.
- JAMES, A.M.; OLIVER, J.H. **Vitellogenesis and its hormonal regulation in Ixodida: preliminary results**. In: Needhan, G.R., Mitchell, R., Horn, D.J., Welbourn, W.C. (Eds), *Acarology IX*, v.2. Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, 1999.
- JIANG, H.; KANOST, M.R. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.95-105, 2000.

- JOHNS, R.; OHNISHI, J.; BROADWATER, A.; SONENSHINE, D.E.; DE SILVA, A.M.; HYNES, W.L. Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge: immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology** 38:99–107, 2001a.
- JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n.4, p. 458-464, 1998.
- JOHNS, R.; SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.857–865, 2001b.
- JURETIC, D.; VUKICEVIC, D.; ILIC, N.; ANTICHEVA, N.; TOSSI, A. Computational design of highly selective antimicrobial peptides. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.49, p.2873–2882, 2009.
- KABARA, J.J.; SWIECZKOWSKI, D.M.; CONLEY, A.J.; TRUANT, J.P. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.2, n.1, p.23-28, 1972.
- KADOTA, K.; SATOH, E.; OCHIAI, M.; INOUE, N.; TSUJI, N.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, N.; MIKAMI, T.; CLAVERIA, F.G.; FUJISAKI, K. Existence of phenol oxidase in the argasid tick *Ornithodoros moubata*. **Parasitology Research**, v.88, p.78-784, 2002.
- KANOST, M.R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v.23, p.291-301, 1999.
- KANOST, M.R.; JIANG, H.; Yu, X.Q. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. **Immunological Reviews**, v.198, p.97–105, 2004.
- KAUFMAN, W.R.; PHILLIPS, J.E. Ion and water balance in the ixodid tick, *Dermacentor andersoni*. I. Routes of ion and water excretion. **Journal of Experimental Biology**, 58, p.523-536, 1973.
- KAWOOYA, J. K.; LAW, J.H. Role of lipophorin in lipid transport to insect egg. **The Journal of Biological Chemistry**, v.263, p.8748-8753, 1988.
- KEELEY, L.L. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, Physiology and biochemistry of the fat body. In: Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. (Eds) 1985 v.3. Integument, Respiration and Circulation. Pergamon Press, Oxford. 1985.
- KLAUDINY, J.; ALBERT, S.; BACHANOVA, K.; KOPERNICKY, J.; SIMUTH, J. Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, p.11-22, 2005.
- KONGSUWAN, K.; JOSH, P.; ZHU, Y.; PEARSON, R.; GOUGH, J.; COLGRAVE, M.L. Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). **Journal of Insect Physiology**, v.56, p.212-226, 2010.
- KOPACEK, P.; WEISE, C.; SARAVANAN, T.; VITOVA, K.; GRUBHOFFER, L. Characterization of an α -macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.465-475, 2000.

- KOVAR, V.; KOPACEK, P.; GRUBHOFFER, L. Characterization of an α -macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.465-475, 2000.
- KUHN, K.H.; HAUG, T. Ultrastructure, cytochemical and immunocytochemical characterization of hemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata). **Cell and Tissue Research**, v.277, p.493-504, 1994.
- KUROOKA, S.; OKAMOTO, S.; HASHIMOTO, M. A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase. **The Journal of Biochemistry**, v.81, p.361-369, 1977.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAMBERTY, M.; ZACHARY, D.; LANOT, R.; BORDEREAU, C.; ROBERT, A.; HOFFMANN, J.A.; BULET, P. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. **Journal Biological Chemistry**, v.276, p.4085-4092, 2001.
- LAMPROU, I.; MAMALI, I.; DALLAS, K.; FERTAKIS, V.; LAMPROPOULOU, M.; MARMARAS, V.J. Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes. **Immunology**, v.121, n.3, p.314-327, 2007.
- LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Haemocytes from *Pseudomonas includens* express multiple α and β integrin subunits. **Insect Molecular Biology**, v.12, n.5, p.441-452, 2003.
- LEE, H.; KWON, H.M.; PARK, J.W.; KUOKAWA, K.; LEE, B.L. N-terminal GGBP homology domain of Gram-negative binding protein 3 functions as a beta-1,3-glucan binding motif in *Tenebrio molitor*. **Biochemistry and Molecular Biology Reports**, v.42, p.506-510, 2009.
- LEMAITRE, B. The road to Toll. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p.521-527, 2004.
- LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster* **Annual Review of Immunology**, v.25, p.697-743, 2007.
- LEMAITRE, B.; REICHHART, J.; HOFFMANN, J. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v.94, p.14614-14619, 1997.
- LEVASHINA, E.A. Innate immune response of *Anopheles gambiae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.34, p.673-678, 2004.
- LEVASHINA, E.A.; LANGLEY, E.; GREEN, C.; GUBB, D.; ASHBURNER, M.; HOFFMANN, J.A.; REICHHART, J.M. Constitutive activation of toll mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. **Science**, v.285, p.1917-1919, 1999.
- LEVY, F.; BULET, P.; EHRET-SABATIER, L. Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. **Molecular and Cellular Proteomics**, v.3, p.156-166, 2004.
- LIMA, C.A.; TORQUATO, R.J.S.; SASAKI, S.D.; JUSTO, G.Z.; TANAKA, A.S. Biochemical characterization of a Kunitz type inhibitor similar to dendrotoxins produced by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) hemocytes. **Veterinary Parasitology**, v.167, p.279-287, 2010.
- LOHNER, K. The role of membrane lipid composition in cell targeting of antimicrobial peptides. **Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies**. Lohner, K. (ed), Horizon Scientific Press, England, p.149-165, 2001.

- LOMER, C.J.; BATEMAN, R.P.; JOHNSON, D.L.; LANGEWALD, J.; THOMAS, M. Biological control of locusts and grasshoppers. **Annual Review of Entomology**, v.46, p.667-702, 2001.
- LOPES, R.B.; ALVES, S.B.; PADULLA, L.F.L.; PÉREZ, C.A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, p.27-31, 2007.
- LOWENBERGER, C.; BULET, P.; CHARLET, M.; HETRU, C.; HODGEMAN, B.; CHRISTENSEN, B.M.; HOFFMAN, J.A. Insect immunity: isolation of three novel inducible antimicrobial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.25, p.867-873, 1995.
- LU, Y.; LU, F.; WANG, X.; BIE, X.; SUN, H.; WUYUNDALAI, LU, Z. Identification of bacteria producing a thermophilic lipase with positional non-specificity and characterization of the lipase. **Annals of Microbiology**, v.59, n.3, p.565-571, 2009.
- LUBECK, I.; ARRUDA, W.; SOUZA, B.K.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C.R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. **Fungal Ecology**, v.1, p.78-88, 2008.
- LUO, T.; ZHANG, X.; SHAO, Z.; XU, X. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. **FEBS Letters**, v.551, p.53-57, 2003.
- LUZ, C.; TIGANO, M.S.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.T.; ALJANABI, S.M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.6, p.839-846, 1998.
- MANZANO-ROMAN, R.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J. Expression of perilipin in human promyelocytic cells in response to *Anaplasma phagocytophilum* infection results in modified lipid metabolism. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p.159-163, 2008.
- MARKWELL, M.A.K.; HAAS, S.M.; BIEBER, L.L.; TOLBERT, N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Analytical Biochemistry**, v.87, p.206-210, 1978.
- MARMARAS, V.J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. **Cellular Signalling**, v.21, p.186-195, 2009.
- MARTIN, H.S.; TIMOTHY, S.; MANICKAM, S.; KENNETH, S.; JOHN, H.L. Proenzyme of *Manduca sexta* phenoloxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. **Proceeding of the National Academy of Science, USA**, v.92, p.7764-7768, 1995.
- MAYA-MONTEIRO, C.M.; DAFFRE, S.; LOGULLO, C.; LARA, F.A.; ALVES, E.W.; CAPURRO, M.L.; ZINGALI, R.; ALMEIDA, I.C.; OLIVEIRA, P.L. HeLp, a Heme Lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.47, p.36584-36589, 2000.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, J.C.A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v.296, p.298-300, 2002.
- METCHNIKOFF, E. **Diseases of the larva of the grain weevil. Insects harmful to agriculture**. Odessa, UA: Odessa Zemstvo Office (in Russian), 1879.

- MICHEL, K.; KAFATOS, F.C. Mosquito immunity against *Plasmodium*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, p.677–689, 2005.
- 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**, v.414, p.756-759, 2001.
- MONTEIRO, S.G.; BAHIANSE, T.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, p.559-563, 2003.
- MOOKHERJEE, N.; HANCOCK, R.E. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.64, n.7-8, p.922-933, 2007.
- MORET, Y.; SCHMIDT-HEMPEL, P. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. **Science**, v.290, p.1166-1198, 2000.
- MULLER, E.E.; FRIED, D.; SHERMA, J. HPTLC analysis of neutral lipids in *Biomphalaria glabrata* snails infected with *Schistosoma mansoni* (Trematoda). **Journal of Planar Chromatography - Modern TLC**, v.13, p.228–231, 2000.
- MULLER, U.; VOGEL, P.; ALBER, G.; SCHAUB, G. The Innate Immune System of Mammals and Insects. Egesten A, Schmidt A, Herwald H (eds): **Trends in Innate Immunity**. Contrib Microbiol. Basel, Karger, v.15, p.21-44, 2008.
- NAKAJIMA, Y.; VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI, A.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.747–751, 2001.
- NAKAJIMA, Y.; VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI, A.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. **Insect Molecular Biology**, v.11, p.611–618, 2002.
- NAPPI, A.J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioessays**, v.22, p. 469–480, 2000.
- NIRMALA, X.; KODRIK D.; ZUROVEC, M.; SEHNAL, F. Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. **European Journal of Biochemistry**, v.268, p.2064-2073, 2001.
- O'HAGAN, J.E. *Boophilus microplus*: Digestion of hemoglobins by the engorged females tick. **Experimental Parasitology**, v.35, p.110-118, 1974.
- OBENCHAIN, F.D.; OLIVER, J.H., Jr. A qualitative analysis of the form, function and interrelationships of the fat body and associated tissues in adult ticks (Acari: Ixodoidea). **Journal of Experimental Biology**, v.186, p.217-236, 1973.
- 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*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p.8969-8977, 2007.
- PARK, B.H. Inactive but dimeric form of lipoprotein lipase in human plasma. **J. Biochemistry and Molecular Biology**, v.34, p.329-333, 2001.
- PENNA, V.M. *Boophilus microplus*: A resistência genética do hospedeiro como forma de controle. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, v.4, p.3-65, 1990.

- 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, p.66-72, 2001.
- PLASCENCIA, Y.G.; ALBORES, V.F.; CIAPARA, H.I. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. **Aquaculture**, v. 191, p.177-189, 2000.
- RACHINSKY, A.; GUERRERO, F.D.; SCOLES, G.A. Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.294-313, 2008.
- RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, p.77–83, 2004.
- RAVICHANDRAN, S.; WAHIDULLA, S.; D'SOUZA, L.; RAMESHKUMAR, G. Antimicrobial lipids from the hemolymph of *Brachyuran crabs*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.162, n.4, p.1039-1051, 2009.
- REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.147-148, p.237–250, 2009.
- RIVALIER, E. & SEYDEL, S. Nouveau procede de culture sur lames gélosés appliqué a l'étude microscopique de champignons deteignes. **Annals of Parasitology**, v.10, n.5, p.444-452, 1932.
- RODRIGUES, J.; BRAYNER, F.A.; ALVES, L.C; DIXIT, R.; BARILLAS-MURY, C. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Science**, v.329, p.1353-1355, 2010.
- ROE, R.M.; DONOHUE, K.V.; KHALIL, S.M.; SONENSHINE, D.E. Hormonal regulation of metamorphosis and reproduction in ticks. **Frontiers in Bioscience**, v.1, n.13, p.7250-7268, 2008.
- ROHLFS, M.; CHURCHILL, A.C. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. **Fungal Genetics and Biology**, v.48, n.1, p.23-34, 2011.
- ROMBACH, M.C.; HUMBER, R.A.; EVANS, H.C. *Metarhizium album* a fungal pathogen of leaf- and plant hoppers of rice. **Transactions of the British Mycological Society**, v.37, p.37-45, 1987.
- ROSELL, R.; COONS, L.B. Determination of vitellogenin titer in the hemolymph of *Dermacentor variabilis* (Acarina: Ixodidae) using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Medical Entomology**, v.28, p.41-45, 1991.
- ROTH, O.; JOOP, G.; EGGERT, H.; HILBERT, J.; DANIEL, J.; SCHMID-HEMPEL, P.; KURTZ, J. Paternally derived immune priming for offspring in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Journal of Animal Ecology**, v.79, p.403–413, 2010.
- ROXSTROM-LINDQUIST, K.; TERENIUS, O.; FAYE, I. Parasite-specific immune response in adult *Drosophila melanogaster*: a genomic study. **European Molecular Biology Organization**, v.5, n.2, 2004.
- RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; GRUBHOVER, L. Gene organization of a novel defensin of *Ixodes ricinus*: first annotation of an intron/exon structure in a hard tick defensin

- gene and first evidence of the occurrence of two isoforms of one member of the arthropod defensin family. **Insect Molecular Biology**, v.16, p.501–507, 2007.
- RUIZ, J.I.; OCHOA, B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. **Journal of Lipid Research**, v. 38, p.1482–1489, 1997.
- RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y.; Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina bouleardi*. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p.167-172, 2001.
- RYAN, R.O., VAN DER HORST, D.J. Lipid transport biochemistry and its role in enzyme production. **Annual Review of Entomology**, v.45, p.233–260, 2000.
- SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annual Review of Entomology**, v.44, p. 159-182, 1999
- SANDS, J. A.; AUPERIN, D. D.; LANDIN, P.D.; REINHARDT, A.; CADDEN, S. P. **Antiviral effects of fatty acids and derivatives: lipid-containing bacteriophages as a model system**. In J. J. Kabara (Ed.), Symposium on the pharmacological effect of lipid. The American Oil Chemists Society: ChPAMaig, IL, USA, 1978.
- SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v52, p.1–18, 2003.
- SCHERFER, C.; KARLSSON, C.; LOSEVA, O.; BIDLA, G.; GOTO, A.; HAVEMANN, J.; DUSHAY, M.S.; THEOPOLD, U. Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. **Current Biology**, v.14, p.625-629, 2004.
- SCHMID-HEMPEL, P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annual Review of Entomology**, v.50, p.529-551, 2005.
- SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins **Toxicon**, v.56, p.1267-1274, 2010.
- SCHRIEFER, M.E. **Vitellogenesis in *Hyalomma dromedarii* (Acari:Ixodidae): a model for analysis of endocrine regulation in ixodid ticks**. PhD. Dissertation. Old Dominion University, Norfolk, Virginia, USA, 1991.
- SCHUHMANN, B.; SEITZ, V.; VILCINSKAS, A.; PODSIADLOWSKI, L. Cloning and expression of Gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.53, p.125-133, 2003.
- SEVALA, V.; SHU, S.; RAMASWAMY, S.B.; SCHAL, C. Lipophorin of female *Blattella germanica* (L.): characterization and relation to hemolymph titers of juvenile hormone and hydrocarbons. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, p.431-441, 1999.
- SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1462, p.55–70, 1999.
- SILVA JR, P.I.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and Characterization of Gomesin, an 18-Residue Cysteine-rich Defense Peptide from the Spider *Acanthoscurria gomesiana* Hemocytes with Sequence Similarities to Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides of the Tachyplesin Family . **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.43, p.33464–3347, 2000.

- SILVA, C.; GARY, B.D.; RAU, M.E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v.24, p.367-379, 2000.
- SILVA, S.B.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Avaliação da resposta celular de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) inoculadas com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium corylophilum* ou *Fusarium oxysporum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, p.151-156, 2006a.
- SILVA, S.B.; SAVASTANO, G.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Tipos celulares envolvidos na resposta imune de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Penicillium* sp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.3, p.129-131, 2006b.
- SILVA, W.O.B.; MITIDIARI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v.40, n.1, p.321-326, 2005.
- SILVA, W.O.B.; SANTI, L.; BERGER, M.; PINTO, A.F.M.; GUIMARÃES, J.A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v.44, p.829-834, 2009.
- SONENSHINE, D.E. **Biology of ticks 1**. New York, Oxford University Press, 1991. 447p.
- SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. **Frontiers in Bioscience**, v.13, p.7046-7063, 2008.
- SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L.; CERAUL, S.M.; MITCHELL, R.; BENZINE, T. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. **Experimental and Applied Acarology**, v.36, p.207-223, 2005.
- SOROKIN, N. Plant parasites of man and animals as causes of infectious diseases. **Journal of Military Medical**, v.2, p.268-291, 1883.
- SREE, K.S.; PADMAJA, V.; MURTHY, Y.L. Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. **Pest Management Science**, v.64, p.119-125, 2008.
- ST. LEGER, R.J.; MAY, B.; ALLEE, L.L.; FRANK, D.C.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.89-101, 1992.
- STANLEY, D.; MILLER, J.; TUNAZ, H. Eicosanoid Actions in Insect Immunity. **Journal of Innate Immunity**, v.1, n.4, 2009.
- STAUBLI, F.; JORGENSEN, T.J.; CAZZAMALI, G.; WILLIAMSON, M.; LENZ, C.; SONDERGAARD, L.; ROEPSTORFF, P.; GRIMMELIKHUIJZEN, C.J. Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v.99, p.3446-3451, 2002.
- STEELE, J. H. Control of metabolic processes. In: Kerkut, G.A.; Gilbert, L.I., Editors, 1985. **Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology**, Pergamon, Oxford, p. 99-146, 1985.
- STEHR, F.; FELK, A.; GÁCSER, A.; KRETSCHMAR, M.; MAHN, B.; NEUBER, K.; HUBE, B.; SCHÄFER, W. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family

during experimental infections and in patient sPAMles. **FEMS Yeast Research**, v.4, p.401–408, 2004.

STOPFORTH, E.; NEITZ, A.W.H.; GASPAR, A.R.M. A proteomics approach for the analysis of hemolymph proteins involved in the immediate defense response of the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, when challenged with *Candida albicans*. **Experimental and Applied Acarology**, v.51, p.309-325, 2010.

STRAND, M.R.; PECH, L.L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annual Review Entomology**, v.40, p.31-56, 1995.

STUART, J.A., GILLIS, T.E.; BALLANTYNE, J.S. Compositional correlates of metabolic depression in the mitochondrial membranes of estivating snails. **American Journal of Physiology -Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.44, n.6, p.1977-1982, 1998.

SUN, J.; HIRAOKA, T.; DITTMER, N.T.; CHO, K.; RAIKHEL, A.S. Lipophorin as a yolk precursor in the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 1161-1171, 2000.

TANG, H.; KAMBRIS, Z.; LEMAITRE, B.; HASHIMOTO, C. Two proteases defining a melanization cascade in the immune system of *Drosophila*. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, p.28097-28104, 2006.

TAYLOR, D. Innate immunity in ticks: a review. **Journal of the Acarological Society of Japan** v.15, p.109–127, 2006.

THOMAS, M.B.; READ, A.F. Fungal bioinsecticide with a sting. **Nature Biotechnology**, v.25, p.1367-1368, 2007.

THOMPSON, D.M.; KHALIL, S.M.S.; JEFFERS, L.A.; SONENSHINE, D.E.; MITCHELL, R.D.; OSGOOD, C.J.; ROE, R.M. Sequence and the developmental and tissue-specific regulation of the first complete vitellogenin messenger RNA from ticks responsible for heme sequestration. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, p.363-374, 2007.

THOMPSON, S.N. Effect of *Schistosoma mansoni* on the gross lipids composition of its vector *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.87B, p.357-360, 1987.

TZOU, P.; REICHHART, J.M.; LEMAITRE, B. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immuno-deficient *Drosophila* mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v.99, p.2152-2157, 2002.

UNTALAN, P.M.; GUERRERO, F.D.; HAINES, L.R.; PEARSON, T.W. Proteome analysis of abundantly expressed proteins from unfed larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, p.141-151, 2005.

VANCE, D.E.; VANCE, J.E. **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes**. 4th ed., Vance, D.E.; Vance, J.E. (Eds.), Elsevier Science B.V., 2002.

VEY, A.; HOAGLAND, R.E.; BUTT, T.M. Toxic metabolites of fungal control agents. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), **Fungi as Biocontrol Agents**. CAB International, New York, pp. 311–346, 2001.

VIERSTRAETE, E.; VERLEYEN, P.; SAS, F.; VAN DEN BERGH, G.; DE LOOF, A.; ARCKENS, L.; SCHOofs, L. The instantly released *Drosophila* immune proteome is

- infection-specific. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.317, p.1052-1060, 2004.
- VILCINSKAS, A.; MATHA, V.; GOTZ, P. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. **Journal of Insect Physiology**, v.43, p.475-483, 1977.
- WANG, C.; SKROBEK, A.; BUTT, T.M. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, n.3, p.168-174, 2004.
- WANG, H.; NUTTALL, P.A. Comparison of the proteins in salivary glands, saliva and hemolymph of *Rhipicephalus appendiculatus* female ticks during feeding. **Parasitology**, v.109, p.517-523, 1994.
- WEBER, A.N.; TAUSZIG-DELAMASURE, S.; HOFFMANN, J.A.; LELIEVRE, E.; GASCAN, H.; RAY, K.P.; MORSE, M.A.; IMLER, J.L.; GAY, N.J. Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. **Nature Immunology**, v.4, p.794-800, 2003.
- WEERS, P.M.M.; RYAN, R.O. Apolipoprotein III: role model apolipoprotein. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.36, p.231-240, 2006.
- WHARTON, R.H. Acaricide resistance and cattle tick control. **Australian Veterinary Journal**, v.43, p.394-399, 1967.
- WHARTON, R.H. Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In: **Control of arthropods of medical and veterinary importance**. London: Pal, R. & R.H. Wharton (ed.). Plenum Press, 1974.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1967. **The principles of insect physiology**. Methuen, London, 742p.
- WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.138, p. 663-670, 1979.
- WOLINS, N.E.; BRASAEMLE, D.L.; BICKEL, P.E. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. **FEBS Letters**, v.580, p.5484-5491, 2006.
- WOOLLEY, T.A. **Acarology. Mites and Human Welfare**. John Wiley, New York, 1988. 484p.
- WU, X.; SUN, J.; ZHANG, G.; WANG, H.; NG, T.B. An antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* cv. 'CloudBean'. **Phytomedicine**, v.15, n.18, p.104-9, 2011.
- YASSINE, H.; OSTA, M.A. *Anopheles gambiae* innate immunity. **Cellular Microbiology**, v.12, n.1, p.1-9, 2010.
- YE, J.; ZHAO, H.; WANG, H.; BIAN, J.; ZHENG, R. A defensin antimicrobial peptide from the venoms of *Nasonia vitripennis*. **Toxicon**, v.56, p.101-106, 2010.
- ZHIOUA, E. R.; LEBRUN, A.; JOHNSON, P.W.; GINSBERG, H.S. Ultrastructure of the haemocytes of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Acarologia**, v.37, p.173-179, 1996.
- ZHIOUA, E.; YEH, M.T.; LEBRUN, R.A. Assay for phenoloxidase activity in *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Parasitology**, v.83, p.553-554, 1997.

ZHU, Y.; THANGAMANI, S.; HO, B.; DING, J.L. The ancient origin of the complement system. **The EMBO Journal**, v.24, p.382-394, 2005.

ANEXOS

Anexo A. Protocolo para dosagem de proteína total pelo método de Lowry modificado (MARKWELL et al., 1978).

Anexo B. Soluções para o preparo do “stacking gel” 5%.

Anexo C. Soluções para o preparo do “resolving gel”.

Anexo D. Protocolo para coloração de gel de poli(acrilamida com nitrato de prata).

Anexo E. Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 25 minutos (microtubo I), que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.

Anexo F - Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo I), que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.

Anexo G - Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo II), que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: imagem ampliada dos espectros iniciais obtidos no modo linear; C: espectro obtido no modo refletido.

Anexo H - Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 39 minutos (microtubo II), que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.

Anexo I - Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 43 minutos e 27 segundos, que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: imagem ampliada dos espectros iniciais do modo linear; C: espectro obtido no modo refletido.

Anexo J - Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 40 minutos que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.

Anexo L- Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 46 minutos e 23 segundos que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.

Anexo A. Protocolo para dosagem de proteína total pelo método de Lowry modificado (MARKWELL et al., 1978).

- 1- Em um tubo de ensaio, colocar 0,2 mL de água destilada, 10 µL de amostra e 1,0 mL de solução alcalina (14,7 mL da solução 20 g Na₂CO₃/100 mL NaOH 1N; 20 g 0,15 mL de Tartarato de sódio e potássio; 0,15 mL de CuSO₄).
- 2- Após leve agitação, manter o tubo de ensaio em repouso durante 15 minutos.
- 3- Adicionar 0,1 mL do reativo de Folin-Ciocalteou (diluído em água destilada na proporção 0,5:1 v/v).
- 4- Após leve agitação, manter o tubo de ensaio em repouso durante 15 minutos.
- 5- Realizar a leitura das absorbâncias das amostras em 660 nm.
- 6- Realizar a curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações de 5 µg/µL, 10 µg/µL, 15 µg/µL e 20 µg/µL, nas mesmas condições descritas acima.

Anexo B. Soluções para o preparo do gel de empacotamento 5%.

Componentes	Quantidade (mL)	
	SDS-PAGE (10 cm x 8 cm)	SDS-PAGE (15 cm x 20 cm)
Água destilada	0,68	6,8
Mix de acrilamida 30%*	0,17	1,7
Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	0,13	1,25
SDS 10%	0,01	0,1
Persulfato de amônio 10%	0,01	0,1
TEMED	0,001	0,01
Volume final	1,0	10,0

Anexo C. Soluções para o preparo do gel de corrida.

Componentes	Quantidade (mL)		
	SDS-PAGE 10% (10 cm x 8 cm)	SDS-PAGE 10% (15 cm x 20 cm)	SDS-PAGE 12% (15 cm x 20 cm)
Água destilada	1,9	15,9	13,2
Mix de acrilamida 30%*	1,7	13,3	16,0
Tris-HCl 1,5 M pH 8.8	1,3	10,0	10,0
SDS 10%	0,05	0,4	0,4
Persulfato de amônio 10%	0,05	0,4	0,4
TEMED	0,002	0,016	0,016
Volume final	5,0	40,0	40,0

Anexo D. Protocolo para coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata.

1- Fixar o gel em solução contendo 50% de metanol, 12% de ácido acético e 0,05% de formaldeído 37% durante 1 h.

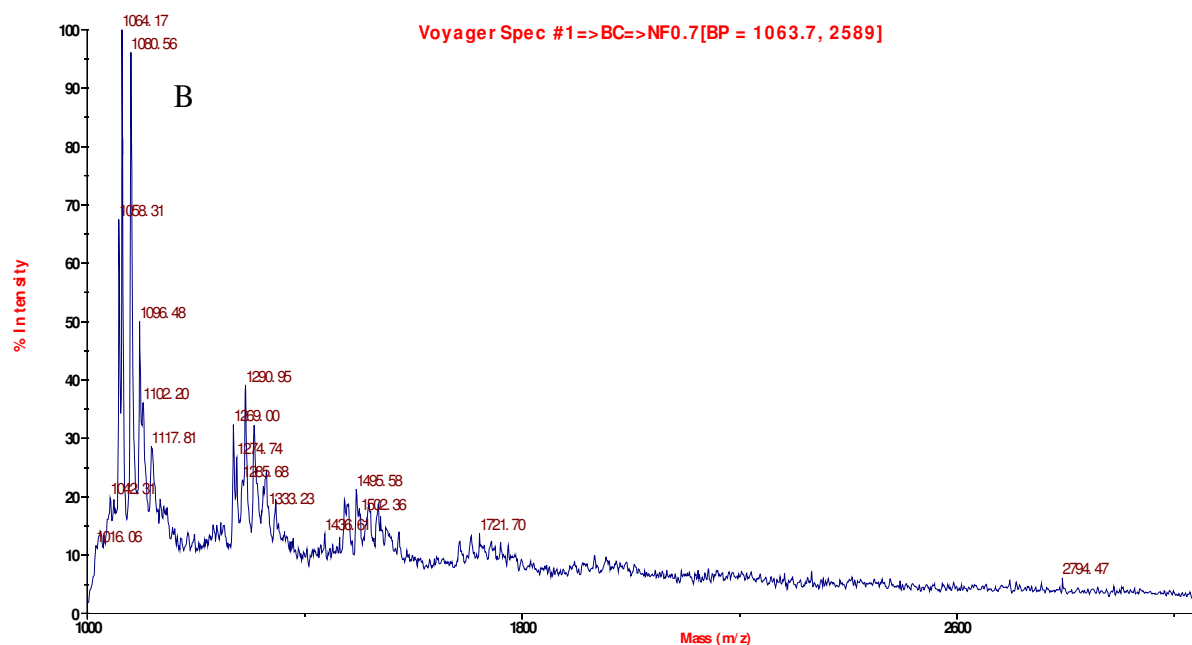
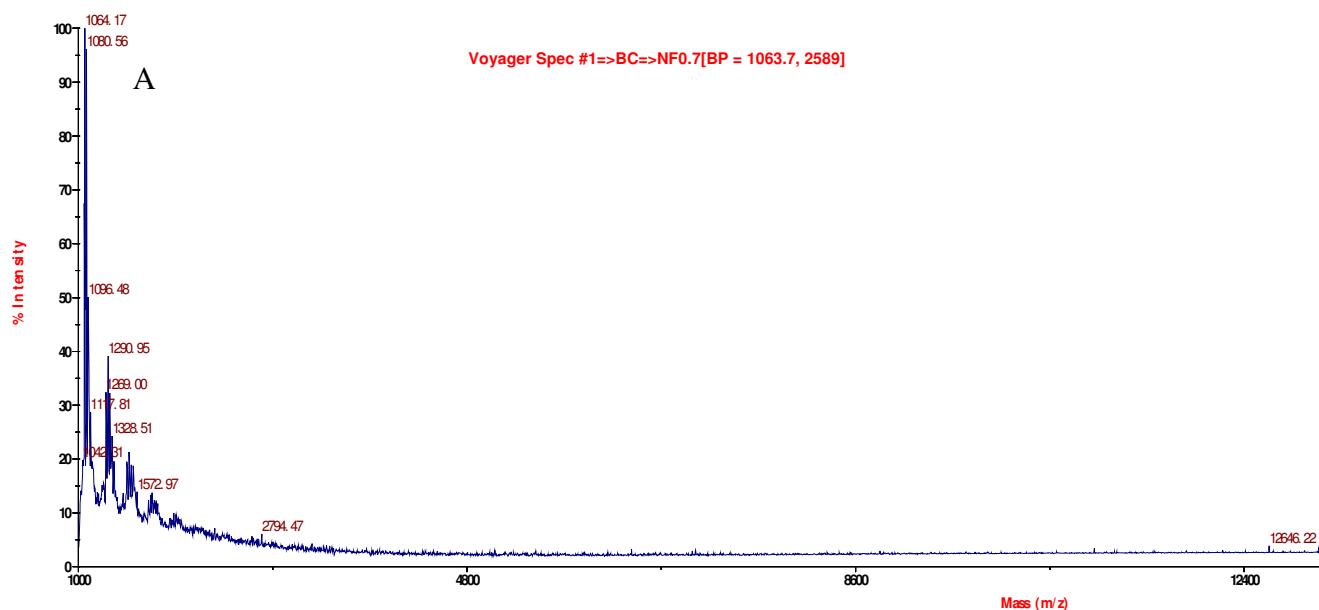
2- Lavar o gel: 20 minutos em etanol 50% (2 vezes), 20 minutos em etanol 30%, 1 minuto em 0,2 g/L de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 20 segundos em água destilada (3 vezes).

3- Corar o gel em solução contendo 2 g/L de nitrato de prata durante 10 minutos e em seguida lavar rapidamente (10 s) em água destilada para retirar o excesso de nitrato de prata da superfície.

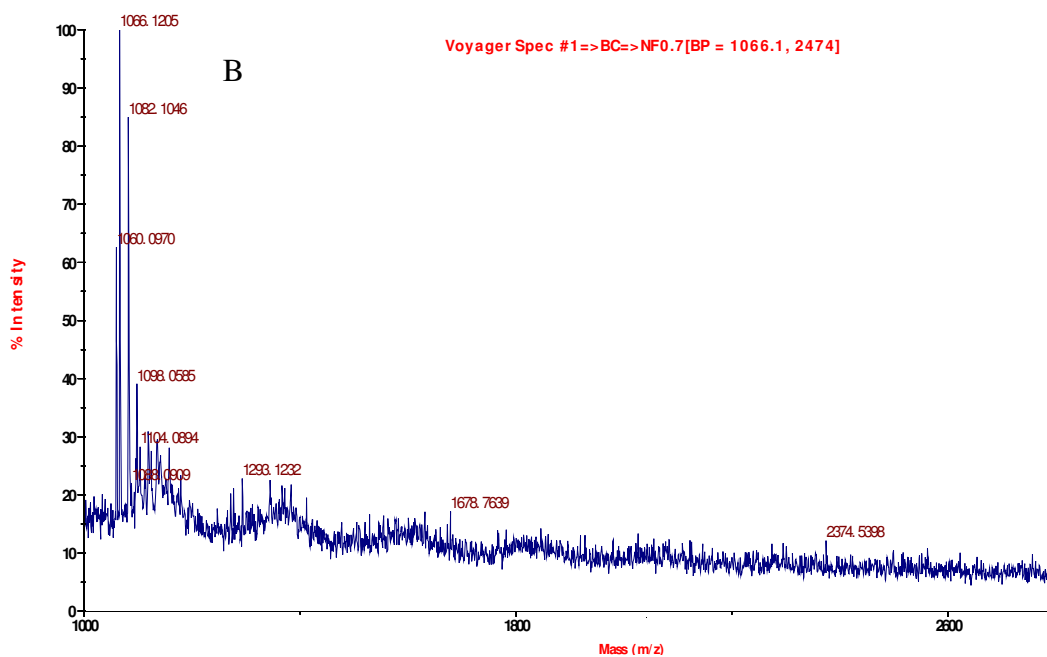
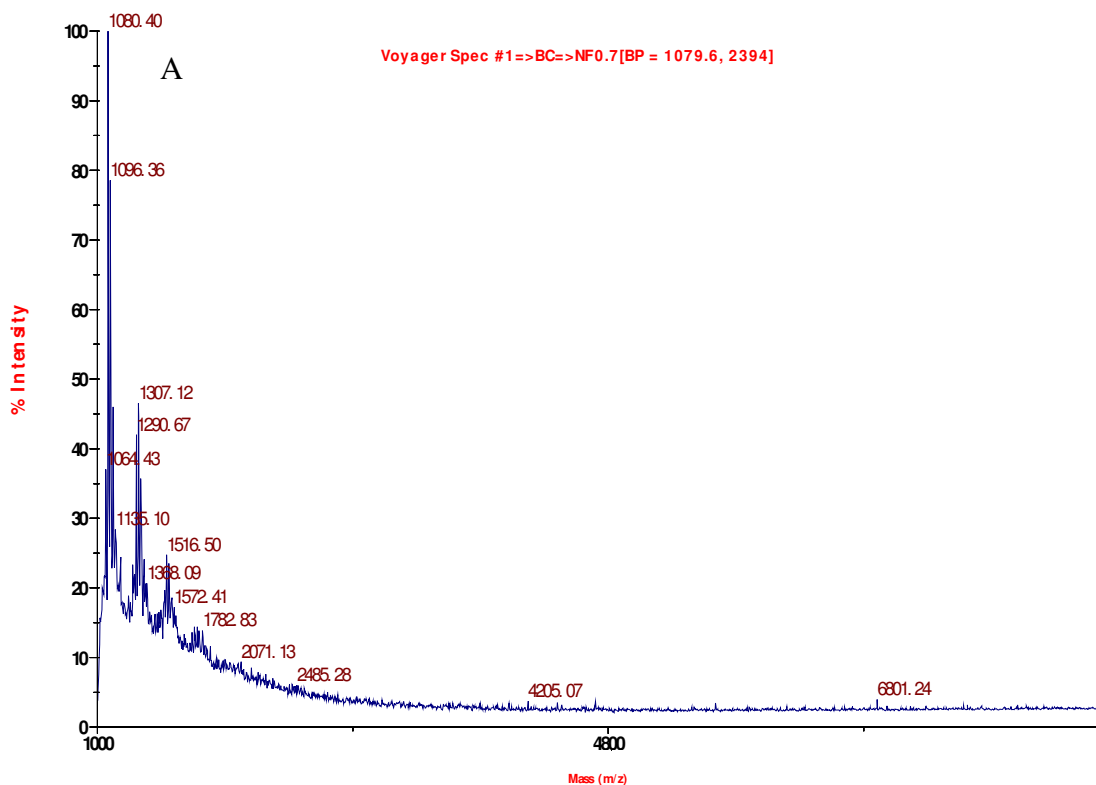
4- Colocar o gel em solução de desenvolvimento contendo 60g/L de carbonato de sódio (Na_2CO_3), 0,05% de formaldeído 37% e 0,05% e 4mg/L de tiosulfato de sódio. Após a visualização das bandas, finalizar a reação com solução de ácido acético 10% durante um minuto.

5- Lavar o gel com água destilada por dois minutos (2 vezes).

Anexo E. Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 25 minutos (microtubo I), que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.

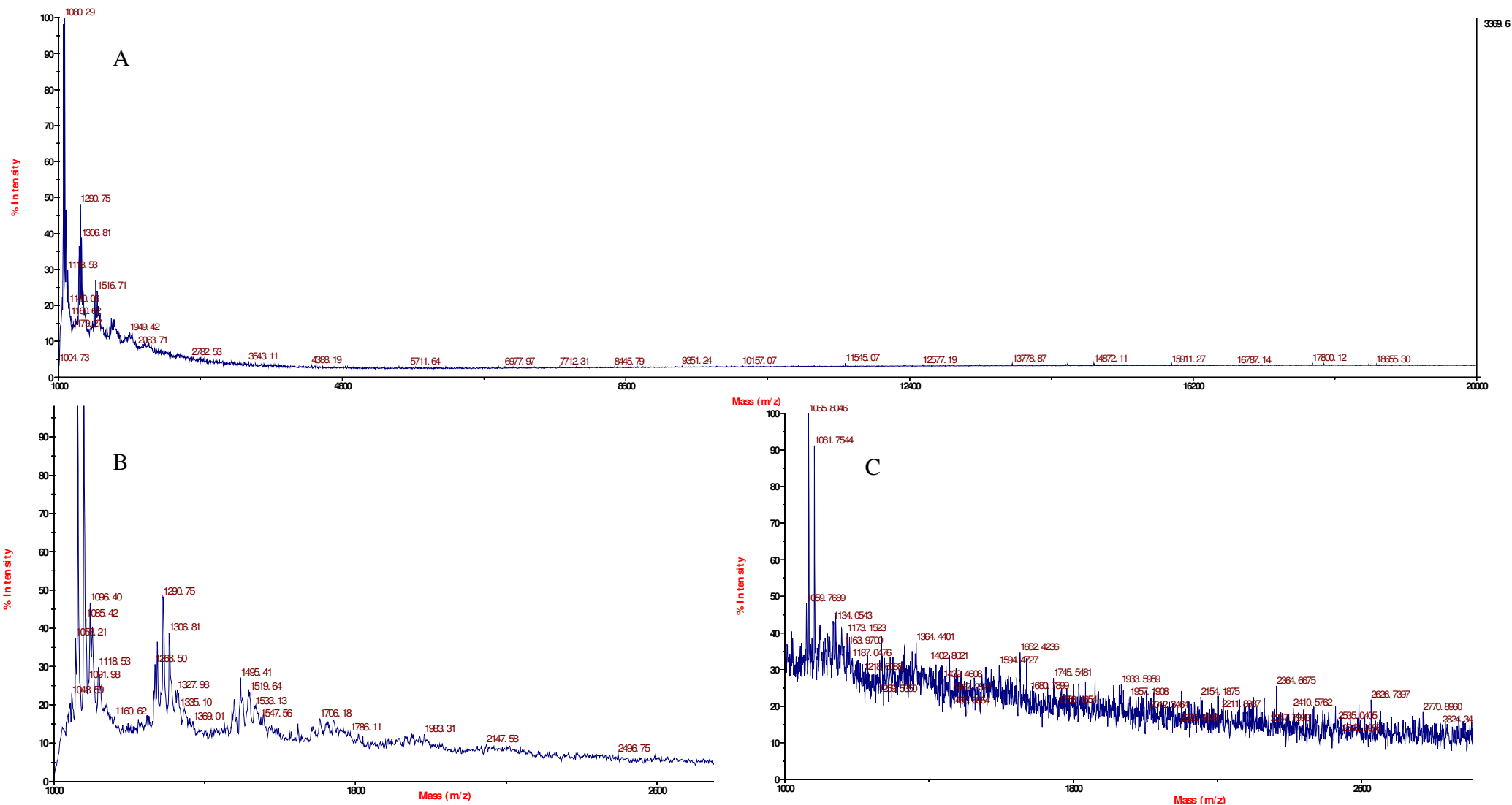


Anexo F. Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo I), que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.

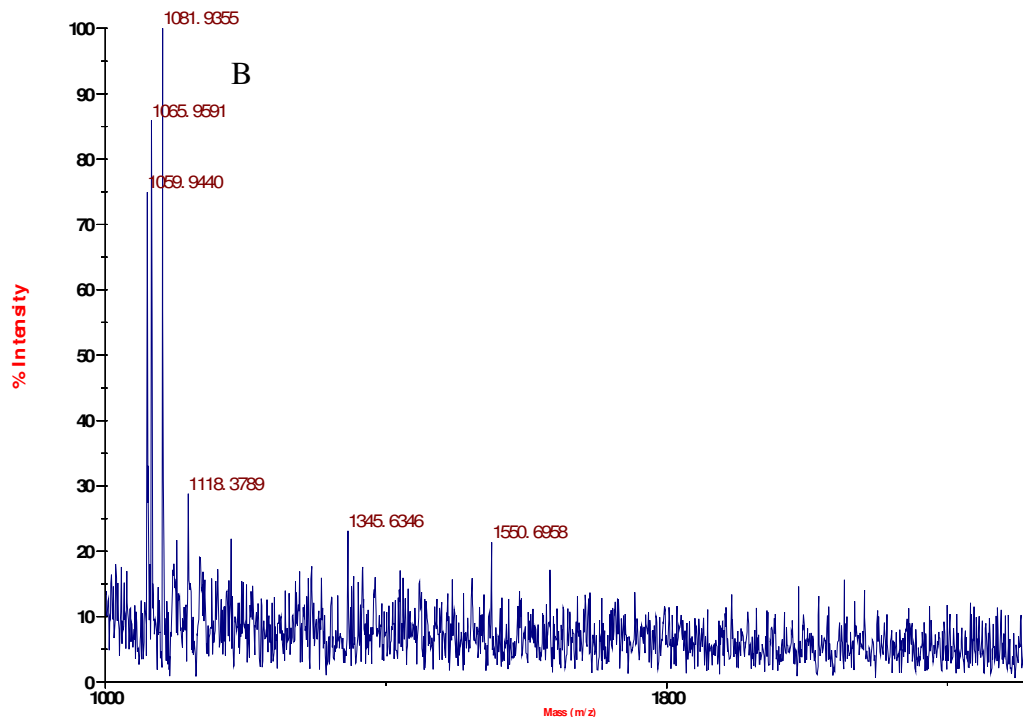
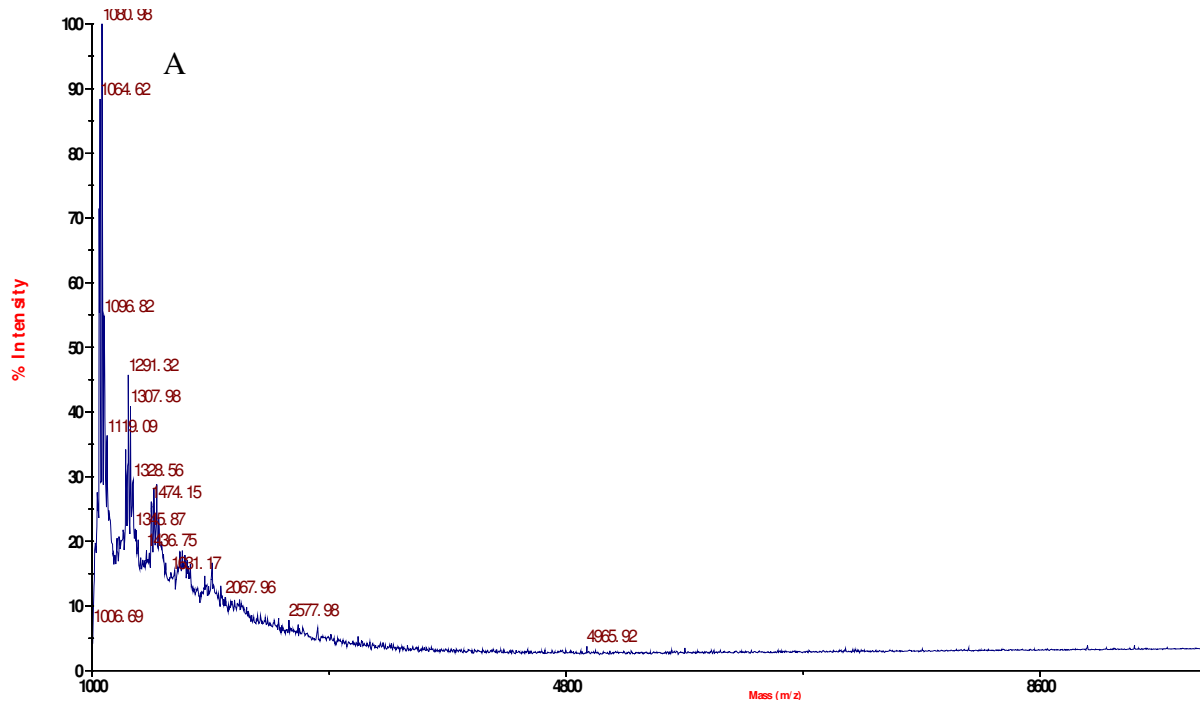


Anexo G. Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 38 minutos e 30 segundos (microtubo II), que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: imagem ampliada dos espectros iniciais obtidos no modo linear; C: espectro obtido no modo refletido.

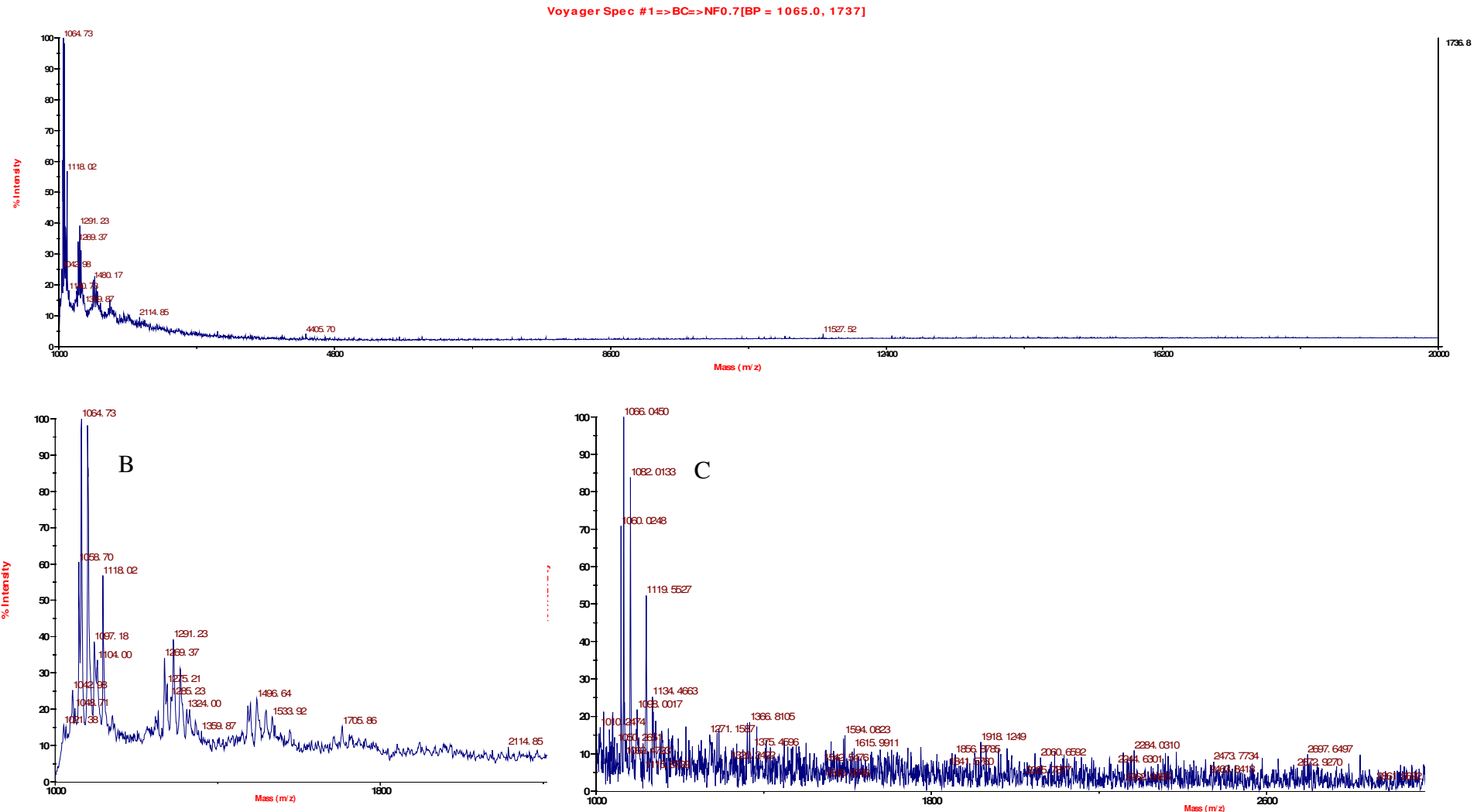
Voyager Spec #1=>BC=>NF0.7[BP = 1079.6, 3370]



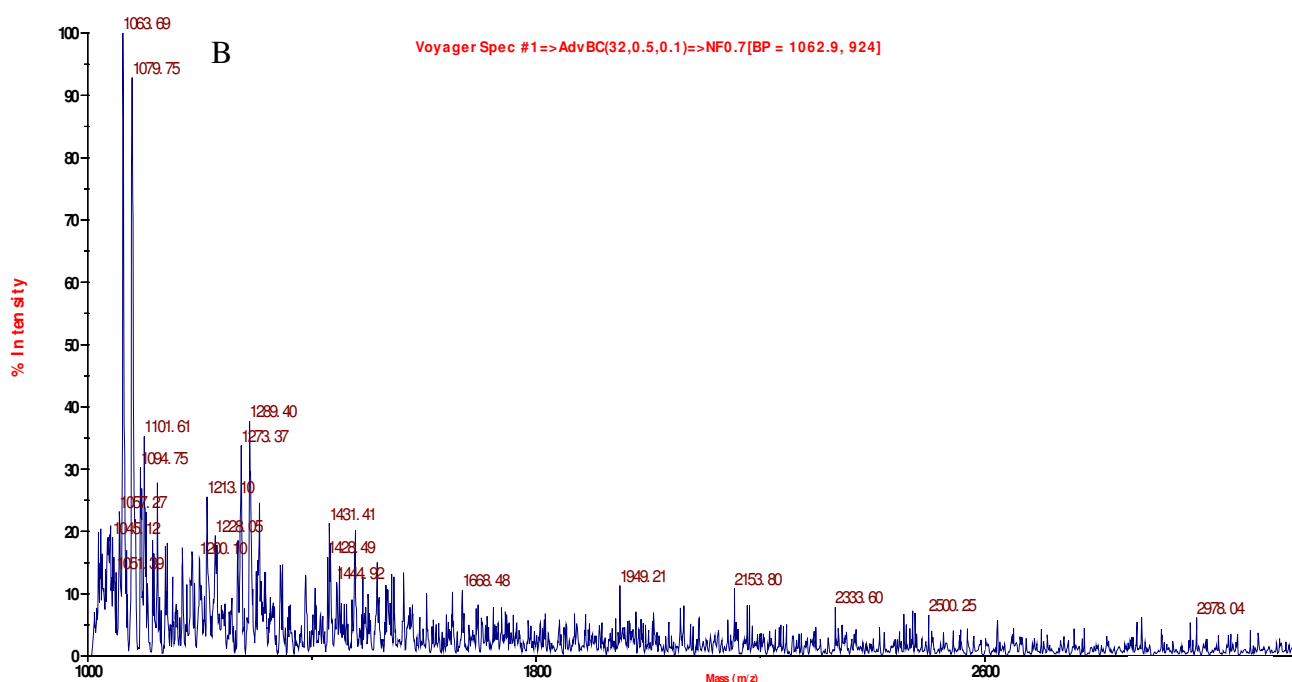
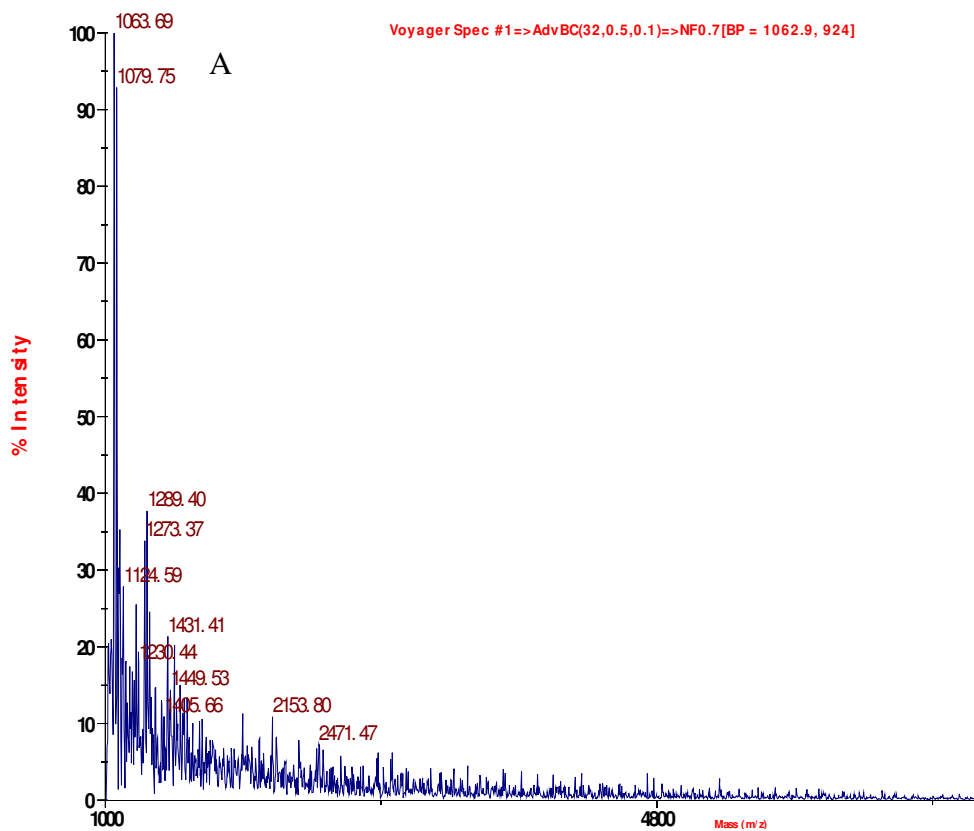
Anexo H. Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 39 minutos (microtubo II), que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.



Anexo I. Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 43 minutos e 27 segundos, que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: imagem ampliada dos espectros iniciais do modo linear; C: espectro obtido no modo refletido.



Anexo J. Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 40 minutos que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.



Anexo L. Espectros de massas da fração da cromatografia de fase reversa (C18), coletada em 46 minutos e 23 segundos que apresentou atividade antimicrobiana. Amostra de plasma da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletada 48 horas após o tratamento por imersão. A: espectro obtido no modo linear; B: espectro obtido no modo refletido.

