

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

DISSERTAÇÃO

**Estudo morfo-fisiológico de hemócitos de fêmeas
ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* infectadas
por *Metarhizium* spp marcado com GFP**

Jéssica Fiorotti de Paulo

2018



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

**ESTUDO MORFO-FISIOLÓGICO DE HEMÓCITOS DE FÊMEAS
INGURGITADAS De *Rhipicephalus microplus* INFECTADAS POR
Metarhizium sp. MARCADO COM GFP**

JÉSSICA FIOROTTI DE PAULO

Sob a Orientação da Professora
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

E Coorientação da Professora
Isabele da Costa Angelo

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P324e Paulo, Jéssica Fiorotti de , 1991-
Estudo morfo-fisiológico de hemócitos de fêmeas
ingurgitadas de Rhipicephalus microplus infectadas
por Metarhizium spp. marcado com GFP / Jéssica
Fiorotti de Paulo. - 2018.
83 f.: il.

Orientadora: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.
Coorientadora: Isabele da Costa Angelo.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, 2018.

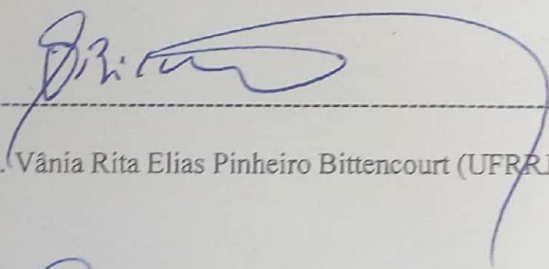
1. Controle biológico. 2. Imunidade celular. 3.
Fungos entomopatogênicos. 4. Carrapato. 5.
Parasitologia veterinária. I. Bittencourt, Vânia Rita
Elias Pinheiro , 1959-, orient. II. Angelo, Isabele
da Costa , -, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. IV. Título.

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

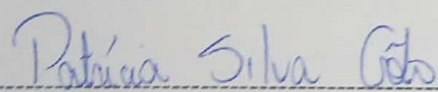
JÉSSICA FIOROTTI DE PAULO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

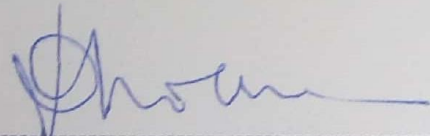
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/2018.



Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt (UFRRJ)



Dra. Patrícia Silva Gôlo (UFRRJ)



Dra. Diva Denelle Spadacci Morena (Instituto Butantan)

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, aos meus queridos pais, à minha irmã e cunhado e aos meus amigos, por aturarem todo o estresse e serem o porto seguro, quando tudo ficava sem luz.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à *Deus*, por me permitir lutar pelos meus ideais, pela força e incentivo quando não havia ninguém mais para abraçar, por conduzir todos os meus passos, e principalmente por estar presente em todas as minhas vitórias.

Aos meus pais *Samuel* e *Rosemi*, pelo investimento na minha educação (a maior herança que vocês poderiam me dar), por todo apoio, por acreditarem nos meus sonhos e acima de tudo por compreenderem todas as minhas ausências durante esses anos. O meu amor por vocês é o meu maior bem, amo vocês.

À minha irmã *Jenaina* e meu Cunhado *Alan* pela amizade e companheirismo, por entenderem também a minha ausência e me incentivarem sempre a crescer. Agradeço também aos sobrinhos de quatro patas *Melão* e *Zara*, pelos lambeijos e afagos toda vez que eu chegava em casa.

Aos meus amigos *Desirée* (minha Soul sister), *Isabela*, *Fillipe* (por ter me apoiado sempre, me aconselhando nos momentos difíceis), *Emily* (preciosa) e *Fernando* que acompanham minha trajetória há anos, estando comigo nos momentos de alegria e tristeza, nos momentos dos puxões de orelha e de comemorações (#fechamento).

Aos amigos da 2009-2, a melhor turma de veterinária da UFRRJ, principalmente as ruralindas, *Candida*, *Maria Eduarda*, *Lidiane*, *Fernanda*, *Juliana*, *Amanda*, *Renée*, *Daniela* por todo apoio, por aguentarem minhas lamentações e por todo carinho dedicado a mim.

À minha orientadora Prof.^a Dra. *Vânia Bittencourt*, pela oportunidade concebida, por acreditar em mim e no meu trabalho, pela amizade e pelos conselhos profissionais e pessoais.

À minha querida co-orientadora Prof. Dra. *Isabele Angelo*, por todo incentivo, pela amizade, paciência e conselhos.

Ao *Laboratório de Controle Microbiano*, pelo meu desenvolvimento como profissional, e aos queridos amigos da família LCM, *Maria*, *Caio*, *Emily* (o quarteto fantástico), *Allan*, *Ricardo*, *Patrícia*, *Mariana*, *Andreia*, *Thais*, *Laura*, *Amanda*, *Michel*, *Julie* e *Taiana* pelos trabalhos em equipe, descontração, viagens aos congressos, vitórias e momentos de choro pelos experimentos falhos e até as madrugadas no laboratório.

Ao grupo Bolsistas Capes pelos vários momentos de descontração, dicas e incentivos em todos os dias após todo estresse.

À CAPES, pelo apoio financeiro da bolsa de mestrado.

E, finalmente, a todos que de alguma forma estavam presentes direta ou indiretamente através do apoio e orações.

BIOGRAFIA

Jéssica Fiorotti de Paulo, filha de Samuel Ângelo de Paulo e Rosemi Maria Fiorotti de Paulo, nasceu em 26 de Outubro de 1991, no município de Ibatiba, Espírito Santo.

Estudou de 2002 a 2008 na Escola Cooperativa Coopeducar, Centro de Educação e Cultura "Saber", localizada no município de Venda Nova do Imigrante- ES, tendo concluído o ensino médio no ano de 2008.

Em Agosto de 2009 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído o mesmo em Março de 2016. No ano de 2010, foi estagiária do Centro de Triagem de Animais Silvestres (IBAMA), em 2011 foi estagiária do Setor de Matrizes do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, em 2012 foi estagiária do laboratório de doenças parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ e no mesmo ano ingressou como bolsista de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq) até 2012. Em 2013, no Laboratório de Controle Microbiano da mesma Universidade, sob orientação da professora Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt, tornou-se bolsista de Iniciação Científica pela FAPERJ, quando foi contemplada com a graduação sanduíche através do programa Ciência sem Fronteiras, sendo bolsista pela CAPES até janeiro de 2015 na Murdoch University - Austrália.

Em Março de 2016 iniciou o Mestrado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. No ano de 2017 foi contemplada com dois prêmios relativos à sua dissertação e foi contemplada com um Edital de Internacionalização para uma missão científica na Universidade de Santiago de Compostela, campus Lugo- Espanha. Durante todo o período de vida acadêmica, participou de diversos congressos e Simpósios na área de pesquisa, tendo participado de cursos de aperfeiçoamento e publicado junto ao grupo de pesquisa resumos e trabalhos científicos em revistas especializadas.

RESUMO

PAULO, Jéssica Fiorotti de. **Estudo morfo-fisiológico de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium* spp. marcado com GFP.** 2018. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Metarhizium spp. é um fungo amplamente utilizado no controle biológico de artrópodes. Os hemócitos, as células presentes no hemolinfa, estão envolvidos na resposta imune destes ectoparasitas, principalmente quando desafiados por patógenos. A obtenção dessas células é dificultosa e muito pouco se conhece sobre a morfologia dos hemócitos de *Rhipicephalus microplus* e sua resposta às infecções. O presente estudo teve como objetivos o estabelecimento de um melhor protocolo para a obtenção de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e a análise morfológica dessas células em condições fisiológicas e quando infectadas por fungos artropodopatogênicos marcados ou não com GFP. Foram testados diferentes velocidades de centrifugação da hemolinfa, e o método com maior viabilidade celular e alta concentração de células foi aplicado após a inoculação fúngica em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Após a exposição por imersão, os parâmetros das fêmeas ingurgitadas avaliados foram o peso da massa de ovos, índice de produção de ovos, período de incubação das larvas, índice nutricional e o percentual de controle. Posteriormente, a coleta de hemolinfa foi realizada e os hemócitos foram separados do plasma, ressuspensos em PBS e quantificados na câmara de Neubauer. Além da quantificação, os hemócitos foram submetidos às colorações de hematoxilina e eosina e PAS, além de serem submetidos à microscopia eletrônica de transmissão. Para a padronização, a centrifugação em $500 \times g$ durante três min a $4^\circ C$ foi considerada mais eficiente, e foi aplicada após inoculação de fungos. Posteriormente, no bioensaio por imersão, os resultados dos dois isolados fúngicos foram muito parecidos entre si, demonstrando que a marcação molecular não influenciou na virulência dos fungos. No entanto, para a quantificação de hemócitos, a inoculação foi utilizada e todos os isolados foram capazes de diminuir a concentração em aproximadamente 80% em comparação com a quantidade de hemócitos de fêmeas não infectadas. Em condições fisiológicas foram identificados cinco tipos de hemócitos (pró-hemócitos, granulócitos, esferulócitos, plasmatócitos e oenocitóides) e quando as fêmeas foram infectadas com *Metarhizium*, estas células apresentavam em processo de morte celular e algumas células também possuíam a internalização do fungo em questão, sugerindo a presença de um processo de fagocitose. Desta forma, sugere-se que a infecção por fungos entomopatogênicos pode gerar alterações nos hemócitos de *R. microplus* e influenciar diretamente na concentração dessas células. Este trabalho foi o primeiro a realizar microscopia eletrônica de transmissão em hemócitos desta espécie de carrapato e foi o primeiro a descrever alterações celulares decorrentes de infecção fúngica através de microscopia eletrônica de transmissão.

Palavras-chave: Resposta imune, fungos artropodopatogênicos, morte celular, carrapato bovino.

ABSTRACT

PAULO, Jéssica Fiorotti de . **Morpho-physiological study of hemocytes *Rhipicephalus microplus* engorged females infected by GFP *Metarhizium* spp.** 2018. 68p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Metarhizium spp. is a fungus widely used in the biological control of arthropods. Hemocytes, cells present in the hemolymph, are involved in the immune response of these ectoparasites, especially when challenged by pathogens. Tick methods for cells obtainment face difficulties and the knowledge about morphology of *Rhipicephalus microplus* hemocytes are very scarce, as well as the cell's responses to infections. The present study had as objectives the establishment of a better protocol for obtaining hemocytes from *Rhipicephalus microplus* engorged females, morphological analysis of hemocytes and their conditions when infected by arthropodopathogenic fungi GFP. Different spin speeds were tested, and the method with higher cell viability and high cell concentration was applied after fungi physical inoculation into *R. microplus* engorged females. In the biological assay, the parameters of egg production, the incubation period of the larvae, the nutrition index and the percentage of control were evaluated followed by immersion of tick females using fungal suspension. After inoculation, hemolymph collection was performed and the hemocytes separated from plasma, resuspended in PBS and quantified in a Neubauer chamber. Hemocytes were submitted to hematoxylin and eosin and PAS staining and analyses of transmission electron microscopy were performed. For standardization, a centrifugation at $500 \times g$ for three minutes at $4^\circ C$ was considered more efficient and applied after inoculation of fungi. Bioassay results of the two fungal isolates yielded very similar data, demonstrating that GFP molecular marking did not influence on fungi virulence against *R. microplus*. Hemocyte's quantification after fungal inoculation showed that all isolates were able to decrease the concentration by approximately 80% in comparison to hemocytes from uninfected females. Under physiological conditions, five types of hemocytes (prohemocytes, granulocytes, spherulocytes, plasmatocytes and oenocytes) were identified and when females were infected by *Metarhizium*, these cells were presented in a cell death process and some cells presented fungus internalized in cytoplasm, suggesting a presence phagocytosis process. It was suggested that infection by entomopathogenic fungi can generate changes in the *R. microplus* hemocytes and directly influence on the concentration of these cells. The present study was the first to perform transmission electron microscopy on hemocytes of this species of tick and was the first to describe the cellular alterations due to fungal infection.

Keywords: Immune response, arthropodopathogenic fungi, cell death, bovine tick.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Isolados de *Metarhizium* spp., *M. robertsii* e *M. anisopliae*, seus hospedeiros de isolamento, regiões geográficas de origem e ano de isolamento. 17
- Tabela 2.** Descrição dos grupos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* estabelecidos para o tratamento por imersão em suspensão conidial com os isolados ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* e ARSEF 549 de *M. anisopliae* marcados com *green fluorescence protein* (GFP) ou a cepa selvagem (Wt)..... 19
- Tabela 3.** Descrição dos grupos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* estabelecidos para o tratamento por inoculação com os isolados ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* e ARSEF 549 de *M. anisopliae* marcados com *green fluorescence protein* (GFP) ou a cepa selvagem (Wt). 20
- Tabela 4.** Efeito sobre os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após imersão em suspensões de *Metarhizium* spp ou 0,1% Tween® 80. Peso Inicial da Fêmea (P. I. F.), Peso Total da Massa de Ovos (P. T. M. O.), Percentual de Eclosão (PE), Índice de Produção de Ovos (I. P. O.), Índice Nutricional (I. N.) e Percentual de Controle (% Controle). 29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Amostras de hemolinfa de *Rhipicephalus microplus* após diferentes protocolos de centrifugação / sedimentação. (A) Protocolo 1: centrifugação a $500 \times g$ durante 3 min a $4^\circ C$ (B) Protocolo 2: centrifugação a $300 \times g$ durante 10 min a $4^\circ C$; (C) Protocolo 3: centrifugação a $5040 \times g$ durante 10 minutos a $4^\circ C$; (D) Protocolo 4: sedimentação por 12h a $8^\circ C$ e, (E) Protocolo 5: sedimentação por 24h a $8^\circ C$. A sedimentação celular está indicada pela seta preta. 26
- Figura 2.** Hemócitos de *Rhipicephalus microplus* visualizados em câmara de Neubauer (20x) obtidos a partir de diferentes protocolos de centrifugação da hemolinfa. (A) centrifugação a $500 \times g$ durante 3 minutos a $4^\circ C$. (B) centrifugação a $300 \times g$ durante 10 minutos a $4^\circ C$. (C) centrifugação a $5040 \times g$ durante 10 minutos a $4^\circ C$. (D) sedimentação durante 24 horas a $8^\circ C$. Hemócitos estão identificados pela seta vermelha e grânulos representados pela seta amarela. 26
- Figura 3.** Um total de 300 células foram contadas em cada protocolo. Percentual de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* não viáveis após cada protocolo. As células impregnadas com azul de Tripán foram consideradas não viáveis. Os valores médios ($\pm DP$) seguidos para a mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($p \geq 0,05$). (-) Não houve visualização do sedimento. Os experimentos foram repetidos duas vezes. 27
- Figura 4.** Concentração de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* obtida após ressuspensão em tampão PBS. Os valores médios seguidos para a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \geq 0,05$). (-) A sedimentação não ocorreu após o processamento. 27
- Figura 5.** Concentração de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* 24 horas após a inoculação de *Metarhizium* spp. Os valores médios seguidos para a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \geq 0,05$). 30
- Figura 6.** Representação de alguns dos tipos celulares encontrados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, em condições fisiológicas normais, através de coloração por Giemsa. (A) Pró-hemócito, (B e C) Granulócito, (D) Plasmatócito apresentando pseudópode e (E) Oenocitóide. 31
- Figura 7.** Tipos celulares encontrados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, em condições fisiológicas normais, através de coloração por Periodic acid-Schiff (PAS). (A,B) Granulócitos, (C,D) plasmatócitos, (E) oenocitóide e (F) esferulócito. Barras (A-E) : $30 \mu m$ e (F): $10 \mu m$ 32
- Figura 8.** Eletromicrografias de esferulócios de *Rhipicephalus microplus* (A, B), apresentando esférulas de diversos formatos e tamanhos (e) e apresentando núcleo (nu). Barra = $5 \mu m$ (A) e barra = $2 \mu m$ (B). 34
- Figura 9.** Eletromicrografias de (A,B) pró- hemócitos de *Rhipicephalus microplus* e (C,D) granulócitos; pró-hemócitos apresentando citoplasma homogêneo, núcleo (nu), algumas mitocôndrias (m) e pouco ou nenhum grânulo eletrondenso (gd); Granulócitos apresentando núcleo (nu), grânulos eletrondensos (gd), grânulos eletróluscentes (gl), algumas mitocôndrias (m) e projeções da membrana plasmática (seta preta). Barra= $2 \mu m$ 35
- Figura 10.** Eletromicrografias de granulócitos de *Rhipicephalus microplus* (A, B, C, D); Granulócitos apresentando núcleo (nu), grânulos eletrondensos (gd), algumas mitocôndrias

- (m) e projeções da membrana plasmática (seta preta) e grânulos eletróluscentes (gl). Barra = 2 μm 36
- Figura 11.** Eletromicrografias de plasmatócitos de *Rhipicephalus microplus* (A, B, C, D); plasmatócitos apresentando núcleo (nu), alguns apresentando poucos grânulos eletrodensos (gd) e eletróluscentes (gl), numerosas mitocôndrias (m), vacúolos (v) e pseudópodes (seta preta). Barra = 2 μm 37
- Figura 12.** Corte semi-finos de microscopia eletrônica de transmissão de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* corados com azul de Toluidina. Barra = 10 μm 38
- Figura 13.** Desenho esquemático das células de *Rhipicephalus microplus*. (A) Oenocitóide, (B,C) granulócito, (D,E) plasmatócito, (F) pró-hemócito. v= vacúolo, g= grânulo e p=pseudópode. 39
- Figura 14.** Eletromicrografia de granulócito e plasmatócitos de *Rhipicephalus microplus* após a infecção por *Metarhizium* spp. (A) Granulócito apresentando núcleo (nu), algumas mitocôndrias (m), grânulos eletrodensos (gd) e deformação em seu contorno celular; (B,C) plasmatócitos apresentando núcleo (nu), lisossomos secundários (ls), mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático rugoso (rr); (D) plasmatócitos apresentando núcleo (nu), lisossomos secundários (ls), vacúolos (v) e a presença de mitocôndrias (m) em proximidade com os lisossomos. Barras = 2 μm 40
- Figura 15.** Eletromicrografia de plasmatócitos de *Rhipicephalus microplus* após a infecção e estruturas fúngicas de *Metarhizium* spp. (A) Plasmatócito apresentando núcleo (nu), grânulos eletrodensos (gd) e eletróluscentes (gl), vacúolos, invaginações da membrana plasmática, possível fagossomo com a estrutura fúngica (Fu), processo não identificado (pa) barra = 2 μm ; (B) estrutura fúngica apresentando dupla membrana, uma parede primária do esporo (ppe) e uma parede secundária do esporo (pse) e mitocôndria (m), barra = 500nm; (C) Estrutura fúngica apresentando parede dupla e núcleo (nu), barra = 500nm; (D) Plasmatócito apresentando núcleo (nu), grânulos eletrodensos (gd) e eletróluscentes (gl), lisossomos secundário (ls) e vacúolos (v), barra = 2 μm ; (E) Plasmatócito apresentando lisossomos secundários (ls), mitocôndrias (m), vacúolos (v) e possível fagossomo com estrutura fúngica germinada (Fu), barra = 2 μm 41
- Figura 16.** Eletromicrografias de granulócitos e plasmatócitos de *Rhipicephalus microplus* após a infecção e estruturas fúngicas de *Metarhizium* spp. (A) Plasmatócito apresentando núcleo (nu), retículo endoplasmático (rr), mitocôndrias (m) e lisossomos secundários (ls) barra = 2 μm ; (B) Granulócito apresentando núcleo (nu), grânulos eletrodensos (gd) e eletróluscentes (gl), mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático (rr), barra = 2 μm ; (C) Plasmatócito apresentando núcleo (nu), mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (rr), barra = 2 μm ; (D) Plasmatócito apresentando pseudópodes (seta preta), mitocôndrias (m) e lisossomos secundários (ls), barra = 2 μm ; (E) estrutura fúngica apresentando uma parede primária do esporo (ppe) e uma parede secundária do esporo (pse), núcleo (nu), mitocôndria (m), processo não identificado (pa) barra = 1 μm 42
- Figura 17.** Eletromicrografias de granulócitos e plasmatócitos de *Rhipicephalus microplus* após a infecção por *Metarhizium* spp. (A) Granulócito apresentando núcleo (nu), algumas mitocôndrias (m), grânulos eletrodensos (gd) e núcleo (nu), barra = 5 μm ; (B) Plasmatócito apresentando núcleo (nu), lisossomos secundários (ls), vacúolos (v), barra representando 2 μm ; (C) Granulócito apresentando núcleo (nu), mitocôndrias (m), grânulos eletrodensos (gd) e eletróluscentes (gl) e grânulos de aspecto tubular (gt), barra = 5 μm ; (D) Plasmatócito apresentando núcleo (nu), lisossomos secundários (ls), vacúolos (v), processo não identificado (pa). Barra = 5 μm 43

- Figura 18.** Corte semi-fino de microscopia eletrônica de transmissão de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* tratados com *Metarhizium* spp. e corados com azul de Toluidina. Barra = 10 μ m. 44
- Figura 19.** Representação esquemática de cortes semi-finos de microscopia eletrônica de transmissão de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* tratados com *Metarhizium* spp. (A, B, C, D e E) Plasmatócitos apresentando vacuolização no citoplasma (v), (F) granulócito apresentando grânulos(g)..... 45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.2 Controle microbiano utilizando fungos artropodopatogênicos.....	4
2.3 Sistema imune humoral de invertebrados.....	6
2.4 Sistema imune celular	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Localização e realização dos experimentos.....	15
3.2. Obtenção de <i>Rhipicephalus microplus</i>	15
3.3 Padronização da técnica de separação dos hemócitos.....	15
3.3.1. Coleta da hemolinfa.....	15
3.3.2 Centrifugação da hemolinfa.....	16
3.4. Obtenção e manutenção dos isolados de <i>Metarhizium spp</i>	16
3.5 Preparo das suspensões e viabilidade Fúngica	17
3.6 Bioensaio com fêmeas ingurgitadas.....	17
3.6.1 Tratamento por imersão.....	17
3.6.2 Tratamento de fêmeas ingurgitadas por inoculação	19
3.6.2.1 Coleta da hemolinfa.....	21
3.6.2.2 Quantificação dos hemócitos totais de fêmeas ingurgitadas	21
3.6.2.3 Identificação dos tipos celulares	21
3.6.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão.....	21
3.7Análise Estatística	23
4 RESULTADOS	24
4.2. Padronização da técnica de separação dos hemócitos.....	24
4.1 Bioensaio com fêmeas ingurgitadas.....	28
4.3 Tratamento de fêmeas ingurgitadas por inoculação.....	30
4.3.1. Quantificação dos hemócitos	30
4.3.2 Identificação dos tipos celulares	30
3.5 Microscopia eletrônica de transmissão	32
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÕES	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são artrópodes da ordem Ixodida e são ectoparasitas hematófagos obrigatórios de diversas espécies animais, incluindo anfíbios, répteis e mamíferos. O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus*, é um artrópode de grande importância em medicina veterinária por ocasionar anemia, perda de peso, depreciação do couro dos animais e ainda por ser vetor de diversos patógenos. Desta forma, o parasitismo deste artrópode gera um prejuízo de 3,24 bilhões de dólares anuais. Devido aos gastos exorbitantes para o controle destes parasitos, os danos ao meio ambiente causados pelo uso desenfreado de produtos químicos e ao aumento da incidência de resistência frente aos parasiticidas tradicionais, o controle alternativo de carrapatos vem sendo estudado.

Dentre os métodos utilizados no controle alternativo, destaca-se o uso de fungos arthropodopatogênicos como *Metarhizium* spp (Hypocreales: clavicipitaceae) devido a sua capacidade de penetração via cutícula, secretando proteases, quitinases e lipases, favorecendo desta forma, a degradação dos constituintes da cutícula.

Neste contexto, fungos com marcadores moleculares têm sido utilizados para um melhor entendimento do mecanismo de penetração e persistência destes no organismo de artrópodes. A proteína GFP, *Green Fluorescent Protein*, tem sido amplamente empregada como marcador molecular em fungos. Esta proteína é produzida pela água marinha *Aequorea victoria* que possui luminescência. Desta forma, o gene repórter é conduzido a uma proteína localizada dentro do citoplasma do fungo através de um promotor constitutivo e assim faz com que o fungo expresse esta proteína fluorescente. Ainda, a ascendência do uso dessa proteína se deve ao fato de que ela é um composto estável e gera baixa ou nenhuma toxicidade quando fundida a outras proteínas e o crescimento e a patogenicidade do fungo não são afetados.

Artrópodes apresentam um líquido que banha a hemocele denominado de hemolinfa, que é responsável por mediar trocas químicas entre os tecidos, além de transportar gases, sendo composta por hemócitos, aminoácidos e hormônios. A resposta imune de artrópodes é dividida em resposta imune humoral e celular. A resposta humoral envolve processos de hemaglutinação e proteínas antimicrobianas enquanto que a resposta imune celular é realizada através dos hemócitos e envolve reações não específicas como a fagocitose, nodulação e encapsulamento.

Basicamente, os carrapatos podem apresentar 5 tipos celulares distintos: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e oenocitóides, sendo encontrados na hemolinfa e podendo ser encontrados também em ligação com o corpo gorduroso, nefrócitos e

glândulas salivares. A densidade dessas células na hemolinfa varia durante a vida do inseto e também na resposta à introdução de patógenos. Contudo, a forma de obtenção dessas células ainda não providencia material suficiente para pesquisas, já que as metodologias empregadas para o carrapato bovino geram grande degranulação celular ou até mesmo morte dessas células.

No entanto, muitas espécies de carrapato têm exibido tolerância à infecção por *Metarhizium* spp. A cutícula do carrapato além de se apresentar como uma barreira física, também pode agir como uma barreira química, prevenindo a infecção fúngica, sendo responsável também pela tolerância do artrópode. Ainda, a suscetibilidade pode ser ocasionada pela resposta imune do artrópode após a infecção fúngica.

Em cada espécie de artrópode, os hemócitos podem reagir de uma diferente maneira frente à uma infecção. O principal mecanismo desencadeado é através de fagocitose, mas outros como encapsulamento e melanização podem ocorrer. No entanto, os esclarecimentos na literatura em relação ao mecanismo celular de defesa do carrapato *R. microplus* frente a uma infecção fúngica por *Metarhizium* spp. ainda são diminutos.

Os objetivos do presente estudo foram analisar a melhor metodologia para obtenção de hemócitos do carrapato bovino, descrever fisiologicamente essas células através de microscopia de luz e eletrônica e analisar a ação que o fungo *Metarhizium* tem sobre essas células.

Sendo assim, um estudo morfo-fisiológico dos hemócitos de carrapatos proporciona um maior esclarecimento sobre a resposta imune celular mediante uma infecção fúngica, assim como as alterações morfológicas nos hemócitos. E por fim, traz informações importantes para o desenvolvimento de estudos futuros envolvendo o controle biológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

Rhipicephalus microplus, o carrapato dos bovinos, Canestrini, 1888 (Acari: Ixodidae) (MURREL; BARKER, 2003) é o principal ectoparasita de bovinos em países tropicais e subtropicais como Austrália e Brasil (DOMINGUEZ-GARCIA et al., 2010). Este artrópode tem importância no cenário mundial devido aos sistemas de produção cárnea e leiteira. Diversos fatores possibilitaram a dispersão desta espécie de carrapato no território brasileiro, sendo as condições climáticas e a presença de raças européias no país um dos fatores mais relevantes (GRISI et al., 2002).

Carrapatos desta espécie estão classificados na Subclasse Acari, da Classe Aracnida Ordem Ixodida e Família Ixodidae (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Anteriormente, a espécie era denominada *Boophilus microplus*. No entanto, a partir de estudos propostos por Murrel e Backer (2003), foi realizada a junção de dois gêneros da família Ixodidae, e então *Boophilus* passou a ser um subgênero do gênero *Rhipicephalus*. Este carrapato é parasita de um único hospedeiro, tendo seu ciclo biológico dividido em uma fase parasitária e outra não parasitária. A parasitária envolve o processo de fecundação, ingurgitamento e queda das fêmeas ao solo, enquanto que a fase não parasitária envolve o processo de oviposição, seguida da eclosão das larvas e o encontro das larvas infestantes com o hospedeiro (WHARTON, 1974).

Além de ser vetor de diversos patógenos como *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*, causadores da tristeza parasitária bovina (HORN; ARTECHE, 1985), *R. microplus* também é responsável principalmente pela perda de produção cárnea e leiteira devido à grande espoliação sanguínea causada por este parasito, levando à anemia e até mesmo predispondo às infecções secundárias e ao aparecimento de míases. Segundo Grisi et al., (2014), os prejuízos causados por este artrópode giram em torno de 3, 24 bilhões de dólares anualmente devido principalmente ao hematofagismo que este acarreta.

Tendo em vista o controle deste ectoparasita, o uso de carrapaticidas químicos vem sendo utilizado de maneira inconsciente. Desta forma, o emprego errôneo destes produtos tem acarretado o desenvolvimento de resistência por parte dos carrapatos às bases químicas empregadas, contaminação de ecossistemas, morte de espécies não-alvo, resíduos de acaricidas em derivados alimentícios de origem animal, contaminação ambiental e comprometimento da saúde animal e humana (PATARROYO et al., 2002). Por isso, a diminuição dos efeitos

deletérios causados por essas moléculas tem sido alvo de numerosos estudos nos últimos anos (ERLER; ATES, 2015; CAMARGO et al., 2016).

Assim, uma das alternativas ao uso de carrapaticidas químicos é a utilização de microorganismos, principalmente fungos, bactérias, e nematoides, sendo estes, potenciais controladores de carrapatos (ZHIOUA et al., 1999; MONTEIRO et al., 2010). O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é considerado um dos agentes de maior representatividade neste grupo, pois apresenta resultados significativos no controle de diversos artrópodes (FANG et al., 2011) além de ocasionar um menor prejuízo ao meio ambiente, levando a uma produção animal mais consciente e mais sustentável (SAMISH et al., 2004).

2.2 Controle Microbiano Utilizando Fungos Artropodopatogênicos

Com o intuito de reduzir o uso de compostos químicos assim como os efeitos deletérios causados por eles, o controle microbiano se destaca no controle alternativo de diversos artrópodes.

Em 1726 surgiu a primeira classificação de entomopatógeno, realizada por Réaumur, no qual foi identificado o gênero de fungo *Cordyceps* atacando um lepidóptero. Posteriormente, o fungo *Beauveria bassiana* foi identificado como agente causador da muscardine branca que tinha relevante importância na produção de bicho-da-seda (ALVES, 1998). E partir destes estudos iniciais, surgiram estudos envolvendo o uso de outras espécies de fungos artropodopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae*. *Metarhizium* spp possui ampla distribuição na natureza e pode ser encontrado no solo mesmo após longos períodos (LANZA et al., 2009). Este fungo apresenta conídios uninucleados, hialinos ou fracamente corados e se formam a partir de conidióforos simples, suas fiáldes são clavadas ou cilíndricas e se desenvolvem a partir do vértice das hifas (DRIVER et al., 2006).

No Brasil, Pestana em 1923 foi um dos primeiros a desenvolver estudos envolvendo fungos atropodopatogênicos, e neste mesmo ano foi feita a identificação de uma espécie denominada de *Penicillium anisopliae* (= *Metarhizium anisopliae* s.l.), sendo este um agente promissor para o controle da cigarrinha *Tomaspis liturata* (ALVES, 1998). O gênero *Metarhizium* é compreendido principalmente por fungos entomopatogênicos, sendo alguns generalistas como é o caso de *M. anisopliae* que pode infectar diversas ordens de insetos, enquanto alguns são especialistas como *M. acridum* que infecta apenas insetos da família Acrididae (GAO et al., 2011; Hu et al., 2014).

O controle microbiano de artrópodes apresenta diversas vantagens como a especificidade e seletividade, efeitos secundários (afetando as gerações futuras do artrópode, como por exemplo, a produção de ovos), permite a comercialização de alimentos sem a presença de resíduos químicos e ainda permite a associação com diversas formas de controle até mesmo com produtos químicos mais seletivos (ALVES, 1998). No entanto, este tipo de controle também apresenta algumas limitações que impossibilitam ainda sua aplicabilidade em larga escala. A ação mais lenta dos microrganismos devido ao seu período de incubação, quando comparados aos inseticidas, impossibilita um efeito imediato dos mesmos. Ainda, os entomopatógenos dependem de condições favoráveis para seu desenvolvimento como temperatura, umidade e radiação solar (ALVES, 1998; FARIA; WRAIGHT, 2007).

Os fungos marcados molecularmente têm sido usados para uma melhor compreensão de como esses entomopatógenos entram e colonizam seus hospedeiros artrópodes. A “*green fluorescent protein*” (GFP), um exemplo desses marcadores, já foi expressa em uma grande variedade de organismos e é considerada uma excelente ferramenta para investigar as propriedades dos fungos filamentosos (SPELLIG, et al. 1996). Esta proteína é produzida pela água marinha *Aequorea victoria* que possui luminescência (SHIMOMURA, 2005). A GFP é um composto estável com baixa ou nenhuma toxicidade quando fundida a outras proteínas, e é relatado que o crescimento e a patogenicidade do fungo não são afetados (HU; ST LEGER, 2002; SCHWARTZ; PATTERSON, 2003). Apesar disso, em *Rhipicephalus annulatus* foi mostrada uma tendência notável de transformantes causar menos mortalidade do que cepas de fungos do tipo selvagem (MENT et al., 2012). Assim, caracterizar a virulência de fungos GFP contra *R. microplus* é notavelmente importante para futuros estudos que pretendam usar carrapatos de bovinos infectados com esses fungos.

O uso de fungos como biocontroladores se destacou entre os demais microrganismos devido ao fato de serem capazes de penetrar ativamente pela cutícula do artrópode, secretando proteases, quitinases e lipases, favorecendo assim a degradação dos constituintes da cutícula (MADELIN 1967; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Fato este confirmado por Bittencourt et al., (1999) ao avaliarem o mecanismo de penetração do fungo *M. anisopliae* em *R. microplus* por microscopia eletrônica de varredura. Ainda, os conídios de *Metarhizium* spp. são geralmente hidrofóbicos e o processo de adesão na superfície do hospedeiro é mediado por genes específicos ou não. Desta forma, a superfície da cutícula dos artrópodes favorece a adesão fúngica, já que a última camada da cutícula é constituída por lipídios, facilitando assim a fixação dos propágulos fúngicos (PEDRINI et al., 2007; ORTIZ-URQUIZA et al., 2013). Os genes

mais importantes no processo de adesão são o *Mad1* e *ssgA* e por isso afetam diretamente a virulência do patógeno (WANG; ST LEGER, 2007; SEVIM et al., 2012). Posteriormente à penetração, as hifas presentes na hemolinfa se diferenciam em blastosporos e o hospedeiro pode morrer por danos físicos ou até mesmo toxinas excretadas pelo fungo (ROBERTS, ST LEGER, 2004). A morte do artrópode é desencadeada pela ação de micotoxinas produzidas pelo fungo, mudanças patológicas que ocorrem na hemolinfa, ação histolítica, bloqueio do sistema digestório e até mesmo morte por pressão mecânica dos órgãos (BIDOCHKA, et al. 1997, ALVES, 1998). No entanto, o hospedeiro pode ter seu sistema imune ativado objetivando a interrupção do processo infeccioso, desencadeando processos imunes como fagocitose, formação de nódulos, melanização, encapsulamento e também a secreção de peptídeos antimicrobianos.

Os fungos podem interagir de diversas maneiras com o meio ambiente, causando a morte dos artrópodes, podendo ser endofítico de plantas, antagonistas de doenças de vegetais, promotores do crescimento de plantas e até mesmo colonizadores da rizosfera (VEGA et al., 2009, BEHIE et al., 2012; JABER; SALEM, 2014, LACEY et al., 2015).

Atualmente, existem diversos produtos no mercado tendo como base fungos artropodopatogênicos. Os pesticidas microbianos representavam em 2007 apenas 1-2% de todos os pesticidas vendidos em uma escala mundial (MARRONE, 2007). No entanto, esses produtos biológicos têm demonstrado um constante crescimento no mercado em comparação à venda de produtos químicos que vem consistentemente diminuindo (THAKORE, 2006). Autores como Glare et al., (2012) já haviam estimado que o crescimento de vendas de produtos biológicos poderia atingir cerca de 3% em 2014. De acordo com o Conselho Científico Agro Sustentável (CCAS), em 2016 foram registrados 277 novos produtos fitossanitários no Brasil e destes, 38 foram biológicos, representando aumento de 65% em relação a 2015 e em 2017 a estimativa de que o mercado de controle biológico atinja 15-20% de crescimento (FARIA, 2017). Mesmo com todo esse desenvolvimento positivo, o potencial uso de fungos artropodopatogênicos no controle de artrópodes ainda se mantém subutilizado, sendo necessários mais estudos e investimentos, principalmente levando em consideração a escassez de produtos para o controle de carrapatos.

2.3 Sistema Imune Humoral de Invertebrados

A hemolinfa é um líquido circulante do corpo dos artrópodes que consiste de uma parcela celular e plasma. Este líquido é importante como fonte de carbono, mas não funciona

como carreador de oxigênio e não existe um pigmento como em mamíferos (heme) para o transporte do mesmo em insetos. Na verdade, a demanda de oxigênio é realizada pelas traquéias (NATION, 2016). O sistema circulatório é necessário para o transporte de nutrientes para as células e os tecidos, principalmente servindo como estoque de trealose que é muito usada como energia, principalmente para aqueles insetos que são adaptados ao voo.

Animais multicelulares possuem diferentes mecanismos de defesa contra os mais diversos patógenos. Esses organismos multicelulares apresentam a imunidade inata composta pela resposta imune celular e a resposta imune humoral, além de também apresentar a resposta imune adquirida mediada por linfócitos B e T. O sistema imune inato depende de fatores codificados germinativos para o reconhecimento e morte de invasores, enquanto que o sistema imunológico adquirido produz receptores por rearranjo de genes somáticos que reconhecem antígenos específicos e que permitem que os organismos desenvolvam uma memória imunológica (FEARON, 1997).

Em artrópodes, a cutícula e o epitélio de órgãos como intestino e ovário agem como a primeira barreira física contra a invasão de agentes patogênicos. No entanto, insetos não desenvolvem a resposta imune adquirida e muito menos apresentam os diferentes tipos de linfócitos e, para suprir a necessidade de um sistema imune mais ativo, estes organismos possuem um sistema imune inato bem desenvolvido que permite uma rápida e generalista resposta aos agentes infecciosos (MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009).

Mesmo que os insetos não apresentem uma imunidade adquirida, uma resposta imune similar foi já descrita em invertebrados, um fenômeno denominado de *priming immune*. Este fenômeno pode estar relacionado com a adaptação do sistema imune em modular a abundância e a resposta de diferentes populações de hemócitos (RODRIGUES et al., 2010).

A resposta imune humoral envolve diversos peptídeos antimicrobianos, cascatas enzimáticas que regulam os processos de coagulação e melanização da hemolinfa e ainda envolve os processos de espécies reativas de oxigênio (GILLESPIE et al., 1997, VASS; NAPPI, 2001; SMITH; PAL, 2014). Já a resposta imune celular envolve os processos de fagocitose, nodulação e encapsulamento (BOMAN, 2003).

Muitos componentes da hemolinfa tem se mostrado muito ativos no reconhecimento e também na eliminação de agentes invasores. Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos, que são componentes da imunidade inata, desempenham uma importante função de agir rapidamente sobre parasitas, fungos e bactérias (BOMAN, 2003; BULET, et al., 2002). O primeiro peptídeo a ser caracterizado foi a cecropina em 1980 (HULTMARK et al., 1980), a

partir desse momento, novos estudos foram sendo desenvolvidos. A produção desses peptídeos é claramente induzida por uma infecção séptica, e seus níveis variam de quase não identificáveis em animais não infectados até centenas de micromolares na circulação durante um período de infecção (IMLER; BULET, 2005; KLEINO; SILVERMAN, 2014). Em carrapatos, as defensas são um dos peptídeos mais conhecidos. Em insetos, essas defensas são primariamente expressas no corpo gorduroso e intestino (HOFFMANN; HETRU, 1992; BOULANGER et al., 2002) após a alimentação ou a invasão de patógenos e a atividade antimicrobiana inicialmente é voltada para bactérias gram-positivas (FOGACA et al., 2004; KOCAN et al., 2008). No entanto, algumas isoformas também podem ser efetivas contra protozoários, bactérias gram-negativas e fungos. Ainda, as defensas também já foram expressas em hemócitos de carrapato (JOHNS et al., 2001; FOGAÇA et al., 2006, ZHOU et al., 2006), ovário (LIMA et al., 2006) e glândulas salivares (LIMA et al., 2006).

Após o reconhecimento de agentes invasores, há o reconhecimento da sinalização que é liberada por células danificadas do hospedeiro. Recentes estudos demonstraram que as enzimas dupla oxidases e peroxidases desempenham um importante papel no processo de sinalização e reconhecimento dessas vias (KIM; LEE, 2014). Ainda, diversos trabalhos têm detalhado o papel essencial da imunidade gerada pela mucosa intestinal dos artrópodes e a hemostasia (BAE et al., 2010, DEKEN et al., 2013). As duplas oxidases também foram identificadas como recursos para a produção de espécies reativas de oxigênio do intestino dos insetos (KIM; LEE, 2014) e desempenham a função de catalisar proteínas *cross-linking* que contribuem para a manutenção da microbiota intestinal em mosquitos (KUMAR et al., 2010). Além de serem expressas no intestino, as duplas oxidases também já foram descritas em ovário e parecem estar envolvidas com o endurecimento da camada externa do ovo através da produção de peróxido de hidrogênio (DIAS et al., 2013).

Diversas cascatas imunes servem para reconhecer e controlar a invasão de patógenos, sendo dependentes da atividade de proteases específicas ou inibidores de proteases. As proteases têm sido identificadas como principal componente para desempenhar processos de coagulação, síntese de peptídeos antimicrobianos e a melanização de patógenos (SOJKA et al., 2011, JIRAVANICHPAISAL et al., 2006). As serpinas são um grupo de serina inibidores de protease que tem seu papel na regulação da inflamação, coagulação do sangue e a ativação do sistema complemento em mamíferos. Ainda, esse grupo tem demonstrado grande contribuição para a imunidade e fisiologia de diversos artrópodes, incluindo carrapatos como *Ixodes scapularis* (MULENGA et al., 2009). Tanto as injúrias causadas em artrópodes assim como a

presença de microrganismos patogênicos podem induzir às duas vias proteolíticas: coagulação e melanização (THEOPOLD et al., 2004).

Três principais vias estão envolvidas na ativação da resposta imune em artrópodes, sendo elas a via Toll, a imunodeficiência (IMD) e a januskinase (JK). A via Toll é ativada na presença de bactérias, vírus e fungos, a via de imunodeficiência é ativada apenas na presença de bactérias gram-negativas e a via JK é semelhante a via de sinalização de citocinas em mamíferos (SHUAI, et al., 1993, LIU et al., 2011).

Bactérias gram negativas e fungos ativam diferentemente as cascatas de serino proteases na hemolinfa. Em *Drosophila*, a maioria dos componentes das cascatas ainda não foram identificados, no entanto, uma kinase conhecida como persefona e que é estimulada pela ação fúngica já foi identificada (LIGOXYGAKIS et al., 2002). Esta kinase cliva a *Spaetzle* que é um ligante ativador da via Toll. E finalmente, quando ativada, a via Toll estimulará uma cascata intracelular de serino proteases no citoplasma de células do corpo gorduroso. Apenas algumas proteínas foram identificadas como participantes das cascatas intracelulares como *Tube* e *Pelle* que são importantes para *Drosophila* (IMLER; HOFFMANN, 2001). Alguns genes que agem na via Toll já foram identificados como *Toll*, *Tube*, *Palle* e *Cactus* e eles são reconhecidos por operarem na resposta antifúngica de *Drosophila* (NATION, 2016).

Já os radicais livres são capazes de reagir com outras biomoléculas e causar danos ao material genético dos artrópodes, além de participar ativamente da sinalização celular (THANNICKAL, FANBURG, 2000). Desta forma, esses radicais são importantes para o desenvolvimento do artrópode e também são indispensáveis para o sistema imune (PEREIRA et al., 2001, MORGAN, LIU, 2011). O que foi demonstrado por Pan et al. (2012), onde mosquitos que foram previamente infectados com *Wolbachia* apresentaram uma maior produção de radicais livres. Assim como, outros pesquisadores já avaliaram que o óxido nítrico, um outro radical livre, tinha toxicidade contra parasitas e diversos patógenos (WANDURSKA-NOWAK, 2004).

2.4 Sistema imune celular

As reações celulares são desencadeadas imediatamente após a invasão de microrganismos e diretamente envolvem o ataque desses microrganismos através dos hemócitos (TAN et al., 2013). Os hemócitos são células circulantes da hemolinfa e que também podem ser encontrados em ligação com o corpo gorduroso, nefrócitos e glândulas salivares (STERBA et al., 2011). Em insetos oito tipos de hemócitos foram encontrados (prohemócitos,

plasmatócitos, esferulócitos, células granulares, coagulócitos, células cristais, oenocitóides e trombocitóides). No entanto, a maioria dos insetos não apresentam todos os oito tipos em um mesmo estágio evolutivo (BROWNE, et al. 2013). A densidade dessas células na hemolinfa varia durante a vida do inseto e também na resposta à introdução de patógenos. Essas células são divididas de acordo com sua morfologia e função.

A classificação desses tipos celulares ainda é controversa em carrapatos, já que alguns autores indicam que existam apenas três tipos básicos de hemócitos, os prohemócitos, plasmatócitos e granulócitos e que os plasmatócitos e granulócitos são as células mais abundantes e estão livremente circulando na hemolinfa de carrapatos duros (CARNEIRO; DAEMON, 2001).

Os prohemócitos são encontrados ocasionalmente na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Ixodes ricinus* e mais frequentemente na hemolinfa de larvas e ninfas de ixodídeos (BALASHOW, 1972). Essas células são pequenas e podem ter um contorno arredondado ou ovalado (7µm x 9µm) com um núcleo bem grande, grande número de mitocôndrias e diversos grânulos (BOROVICKOVA; HYPISA, 2005). Em microscopia eletrônica, essas células contêm ribossomos e mitocôndrias, mas pouco retículo endoplasmático e complexo de Golgi (NATION, 2016). Em insetos, essa célula representa até 10% do volume de células circulantes, e tem sido classificada como células progenitoras. No entanto, recentes estudos têm demonstrado que elas também podem desempenhar processos de fagocitose e que elas podem surgir a partir da divisão assimétrica dos granulócitos, sugerindo que estas células não são multipotentes (CASTILLO et al., 2006; KING; HILLYER, 2013; HILLYER; STRAND, 2014).

Os granulócitos de *I. ricinus* são maiores (12µm x 9µm) e possuem numerosos grânulos de até 2µm de diâmetro no citoplasma (BOROVICKOVA; HYPISA, 2005). Os grânulos em testes histoquímicos podem ser compostos por mucopolissacarídeos e glicoproteínas. São as células mais abundantes em insetos, podendo representar até 95% da população total e apresentam uma forte atividade de fosfatase ácida. Em Insecta, a função deste tipo celular ainda é imprecisa, no entanto, alguns pesquisadores sugerem que elas têm a função de estoque e possivelmente funções secretórias (NATION, 2016).

Os plasmatócitos são as células mais abundantes em carrapatos da família Ixodidae e eles possuem um tamanho variado (11µm x 9 µm) assim como uma forma variada. Esses tipos de células não apresentam granulações, mas tem os filopódios como característica marcante, apresentam lisossomos primários e secundários, além de poderem apresentar também gotículas de lipídios no citoplasma (BOROVICKOVA; HYPISA, 2005). São células que tem seu papel

voltado para a fagocitose de agentes patogênicos (KUNH; HAUG, 1994). Ainda, essas células podem conter enzimas lisossomais e podem estar envolvidas em outros processos como encapsulamento, nodulação e no processo de cicatrização em insetos (LACKIE, 1988, RATCLIFFE; GOTZ, 1990).

Os esferulócitos são células menos abundantes, são de maior tamanho (11 μ m x 14 μ m). Essas células são caracterizadas por apresentarem grânulos brilhantes de formato tubular que completa quase todo o interior da célula (BOROVICKOVA; HYPISA, 2005). Ainda não se sabe a função deste tipo celular, no entanto, acredita-se que também podem estar envolvidos no processo de fagocitose em alguns insetos (NATION, 2016).

Os oenocitóides foram observados em um grupo limitado de carrapatos. As células deste tipo apresentam um formato ovalado, são grandes em tamanho (18,3 μ m x 11,9 μ m) e apresentam numerosas invaginações na membrana plasmática além da presença de grânulos no citoplasma (BRINTON; BURGDORFER, 1971). Em insetos, essas células compreendem certa de 10% dos hemócitos circulantes, possuem núcleo excêntrico e citoplasma homogêneo, podem ser binucleadas e lisam facilmente sem ocasionar coagulação da hemolinfa, e não são células fagocíticas. Ainda, são células produtoras de peroxidases, que são enzimas limitantes no processo de melanização (LACKIE, 1988; HILLYER; STRAND, 2014).

Os hemócitos são responsáveis pela resposta imune celular de artrópodes e participam dos processos de fagocitose, nodulação e encapsulamento. No entanto, também existem outros processos imunes que funcionam em concordância com a resposta imune celular para a eliminação de agentes patogênicos da hemolinfa desses artrópodes (TSAKAS; MARMARAS, 2010). Os hemócitos participam do processo de cicatrização através do processo de agregação na área da lesão, onde algumas células fagocitam debris celulares ou patógenos. Alguns autores chegam a correlacionar a função de alguns hemócitos com os fagócitos de mamíferos (BROWNE et al., 2013).

A fagocitose nada mais é que o reconhecimento, o englobamento e a destruição de patógenos invasores ou de células em processo de apoptose por hemócitos. Em mamíferos, o processo de fagocitose é desencadeado por células mononucleares como macrófagos e monócitos e por um tipo de célula polimorfonuclear, que é o neutrófilo. No entanto, em insetos, a fagocitose é desencadeada principalmente por plasmatócitos e granulócitos que estão circulantes na hemolinfa (LAMPROU et al., 2005; LAMPROU et al., 2007). Mesmo que outras células possam estar envolvidas também nesse processo como os oenocitóides, mais estudos

são necessários para entender o verdadeiro papel desempenhado por essas células (LING, HU, 2005).

A fagocitose é um processo complexo que envolve a interação entre o fagócito e o patógeno, dependendo da sinalização e respostas efetoras. Assim, a fagocitose se inicia quando ocorre a indução da superfície do fagócito por células alvo. Alternativamente, os patógenos podem ser reconhecidos diretamente por receptores de superfície como por exemplo, a calreticulina e apolipoproteína (BROWNE et al., 2013). O processo fagocítico também é muito importante para o desenvolvimento dos insetos, já que este também é responsável pela limpeza de hemócitos que sofreram morte celular (MAMALI, et al., 2008). Ainda, este processo geralmente não é destrutivo para os hemócitos, ao contrário de outros processos como melanização, coagulação e encapsulação que acabam com a vida útil das células (BROWNE et al., 2013).

O processo de nodulação é a reação de defesa celular predominante em insetos e se refere a um agregado de hemócitos que englobam bactérias maiores. Os eicosanoides mediam a nodulação em diversas espécies de insetos e algumas enzimas podem estar envolvidas no processo de nodulação de hemócitos de moscas (MILLER et al., 1999; SIDERI et al., 2008).

O encapsulamento se refere à ligação dos hemócitos aos grandes invasores como protozoários e helmintos. Após se aderirem ao patógeno alvo, os hemócitos formam uma cápsula com multicamadas ao redor do patógeno e posteriormente ocorre o processo de melanização. Dentro da cápsula, o agente patogênico é inativado pela produção local de radicais livres citotóxicos ou por asfixia (NAPPI et al., 1995; NAPPI; OTTAVIANI, 2000).

A melanização já se refere ao processo de formação de melanina. Este processo tem uma fundamental importância na defesa de uma variedade de patógenos e participa do processo de cicatrização, assim como a formação da cápsula em diferentes espécies de lepidópteros e moscas. O processo de formação de melanina é dependente do metabolismo da tirosina (LAVINE; STRAND, 2001; LAVINE; STRAND, 2003).

Claramente que em cada espécie de artrópode, os hemócitos vão reagir de uma diferente maneira frente à infecção. Em *Aedes aegypti*, quando este inseto é desafiado por *Escherichia coli*, a resposta dos hemócitos para esta infecção é através de fagocitose. Enquanto que para outras bactérias como *Micrococcus* é a melanização (HERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2002, HILLYER et al., 2003). Desta forma, vários mecanismos distintos estão envolvidos no processo de fagocitose em insetos.

A presença de carboidratos nas células é muito importante para fisiologia do artrópode, sendo compostos energéticos responsáveis por fisiologicamente agir na reparação tecidual e na proliferação celular. Desta maneira, quando um artrópode é desafiado por um patógeno, as células podem ser mobilizadas para a liberação de carboidratos, diminuindo a concentração dos mesmos no citoplasma dos hemócitos (CUNHA et al., 2012).

Em relação aos lipídios, os hemócitos de insetos possuem deposição lipídica em seu interior, sendo uma glicoproteína denominada mucina a mais importante devido à sua atividade microbiológica, agindo na agregação e encapsulamento em vertebrados e invertebrados (NIEUW AMEROGEN; VEERMAN, 2002). Ainda, quando desafiado por patógenos, a deposição lipídica em insetos pode ser influenciada (GUIMARAES et al., 2014).

O número de hemócitos circulantes em insetos é variável de acordo com a espécie e dentro de um mesmo indivíduo em momentos fisiológicos diferentes. O sexo, a idade e o estágio de desenvolvimento do artrópode podem influenciar no número de células a serem observadas. Ainda, alguns hemócitos são encontrados aderidos em alguns órgãos e são liberados para a circulação apenas após determinadas circunstâncias como a muda de estágio evolutivo e durante infecções (NATION, 2016). A concentração de hemócitos circulantes em mosquitos adultos pode diminuir com a idade do inseto, pode aumentar após o repasto sanguíneo e pode aumentar ou diminuir quando o artrópode é desafiado por patógenos (CASTILLO et al., 2006; HILLYER et al., 2005; BRAYNER et al., 2007; BRYANT; MICHAEL, 2014; CASTILLO et al., 2011). Estudos realizados em adultos de *Anopheles gambiae* demonstraram que estes possuem mais hemócitos circulantes que *A. aegypti* em condições fisiológicas normais (COGGINS et al., 2012; CASTILLO et al., 2006). Em carrapatos, a quantidade de hemócitos circulantes na

hemolinfa pode variar durante uma infecção fúngica. Autores como Silva et al. (2006) e Freitas et al. (2015) demonstraram que ocorre uma redução do número de hemócitos circulantes quando fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* são infectadas por *B. bassiana*, elucidando o papel imunossupressor que os fungos desempenham. No entanto, o número de hemócitos circulantes, seja em insetos ou em carrapatos, ainda é muito controverso.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização de Realização dos Experimentos

Os experimentos foram realizados no período de Março/2016 a Julho/2017 nas instalações dos:

- *Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes* (LCM) localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ, Brasil;
- *Laboratório de Fisiopatologia* do Instituto Butantan, São Paulo – SP, Brasil.

3.2. Obtenção de *Rhipicephalus microplus*

A obtenção de *Rhipicephalus microplus* foi feita na EPPWON do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ. Foram utilizadas fêmeas ingurgitadas coletadas do piso das baias de animais artificialmente infestados e mantidos estabulados (aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRRJ nº113/2014). Após a coleta, as fêmeas ingurgitadas foram lavadas em água corrente e imersas por três minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% para a higienização da cutícula, sendo posteriormente secas, identificadas e pesadas.

3.3 Padronização da técnica de separação dos hemócitos

3.3.1. Coleta da hemolinfa

As fêmeas foram divididas em cinco grupos homogêneos contendo 20 fêmeas em cada (sendo realizadas 3 réplicas de cada grupo). A coleta da hemolinfa foi realizada através da superfície dorsal da cutícula das fêmeas, que foi perfurada com auxílio de uma agulha de 0,3 mm, a partir de suave pressão sobre o corpo do carrapato, realizando a coleta com um capilar de vidro da mesma espessura da agulha acoplado a uma borracha flexível (ANGELO et al., 2010). As amostras foram alocadas 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) e mantidas no gelo durante toda a coleta.

3.3.2 Centrifugação da hemolinfa

Posteriormente à coleta, os microtubos contendo hemolinfa foram submetidos a diferentes velocidades de rotação e tempo ou períodos de sedimentação, conforme descrito a seguir: protocolo 1 - centrifugação a $500 \times g$ durante três minutos a $4^\circ C$ de acordo com Gillespie et al. (1997), protocolo 2 - centrifugação a $300 \times g$ durante 10 min a $4^\circ C$ de acordo com Fogaça et al. (2004), protocolo 3 - centrifugação a $5040 \times g$ durante 10 min a $4^\circ C$ de acordo com Silva et al. (2006), protocolo 4 - 12 horas de sedimentação e protocolo 5 - 24 horas de sedimentação .

Ao término da centrifugação ou sedimentação, os hemócitos separados do plasma foram ressuspensos em 20 mL de PBS (tampão fosfato 0,1M, NaCl 1.5 M, pH 7.4). Então, foi estimado o número de células viáveis com o uso de corante azul de Tripán (Prolab) que cora apenas células não viáveis (KONOPKA et al., 1996). Os hemócitos foram analisados e quantificados em câmara de Neubauer sob microscopia óptica em microscópio binocular ZEISS 042 em magnificação de $40\times$. O volume de hemolinfa foi quantificado e padronizado para 50 mL. Para a avaliação das metodologias foi analisado a quantificação total das células em câmara de Neubauer, a viabilidade celular e a presença ou não de grânulos.

3.4. Obtenção e Manutenção dos Isolados de *Metarhizium spp*

Para a realização dos experimentos foram utilizados dois isolados fúngicos, o isolado ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* e o isolado ARSEF 549 de *Metarhizium anisopliae*, ambos cedidos pelo pesquisador Donald Roberts da Utah State University, EUA (tabela 1), sendo utilizados os isolados que expressam GFP e sua respectiva cepa selvagem (Wt).GFP foram utilizados para verificar se a marcação molecular interferia na virulência do fungo. Os isolados foram mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade (cultivado em meio Batata-Dextrose-Agar (BDA), temperatura de $25 \pm 1^\circ C$ e umidade relativa $\geq 80\%$ durante 14 dias). Após esse período, as placas de Petri contendo os isolados foram armazenadas a $4^\circ C$ até a realização dos ensaios, sendo o armazenamento não superior a três meses.

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium* spp., *M. robertsii* e *M. anisopliae*, seus hospedeiros de isolamento, regiões geográficas de origem e ano de isolamento.

Isolado	Hospedeiro do isolamento	Origem Geográfica	Ano
ARSEF 2575	Coleoptera: Curculionidae	Carolina do Sul, EUA	1988
ARSEF 549	Lepidoptera:Galacticidae	Brasil	

3.5 Preparo das Suspensões e Viabilidade Fúngica

Os conídios de cada isolado fúngico foram raspados da superfície do meio de cultura, suspensos em solução de água destilada estéril e Tween® 80 a 0,1% (Sigma) (LUZ et al., 1998) e quantificados com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico, segundo Alves (1998), na concentração de 10^8 conídios mL⁻¹. Posteriormente, foi realizada uma diluição para obtenção de uma suspensão 10^7 conídios mL⁻¹.

Uma alíquota de 10µL da suspensão contendo 10^7 conídios/mL de cada isolado de *Metarhizium* spp. foi depositada em placa de Petri contendo meio BDA, sendo incubadas sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ durante 24 horas. A determinação do percentual de germinação dos conídios foi realizada segundo Alves (1998).

3.6 Ensaio biológico com Fêmeas Ingurgitadas

Para os bioensaios, foram realizados dois tipos de tratamento, um por imersão e outro por inoculação da suspensão conidial. No tratamento por imersão foram analisados os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas como o peso inicial das fêmeas, peso total da massa de ovos, percentual de eclosão das larvas, peso residual das fêmeas, índice de produção de ovos, índice nutricional, eficiência reprodutiva e percentual de controle. Já para o tratamento por inoculação, a hemolinfa foi coletada para processamento e posterior quantificação e tipificação dos hemócitos de *R. microplus*.

3.6.1 Tratamento por imersão

Para o bioensaio, as fêmeas foram pesadas individualmente e divididas em nove grupos contendo dez fêmeas em cada, baseando se na fórmula de Yule (SAMPAIO, 2002). Desta forma, após a pesagem, as fêmeas foram imersas em 1mL, durante três minutos, nas suspensões fúngicas ou na solução controle (água destilada com Tween ® a 0,1%) com as divisões de grupo como apresentado na tabela 2. Após o tratamento, o excesso de suspensão foi retirado e as

fêmeas foram fixadas em placa de Petri com auxílio de fita adesiva e foram acondicionadas sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ para a avaliação dos parâmetros biológicos.

Diariamente a postura das fêmeas foi pesada e alocada em tubos para a avaliação do percentual de eclosão das larvas. Os parâmetros biológicos avaliados foram o peso inicial das fêmeas (P.F), peso total da massa de ovos (P.T.M.O), percentual de eclosão das larvas(%E), peso residual das fêmeas(P.R), índice de produção de ovos(I.P.O.), índice nutricional(I.N), eficiência reprodutiva(E.R.) e percentual de controle(%C).

O peso inicial das fêmeas é o peso da fêmea aferido individualmente antes do tratamento, o peso da postura é o somatório da postura diária de cada fêmea. O percentual de eclosão das larvas é a avaliação subjetiva do percentual de larvas eclodidas em relação ao total de ovos. O peso residual das fêmeas é o peso individual da fêmea três dias após o término da postura. O índice de produção de ovos é a razão entre o peso da massa de ovos e o peso inicial da fêmea multiplicada por 100 (BENNETT, 1974). O índice nutricional é a razão entre o peso da massa de ovos e a subtração entre o peso inicial da fêmea e seu respectivo peso residual, sendo a razão multiplicada por 100 (BENNETT, 1974). A eficiência reprodutiva é a razão entre o peso da massa de ovos e peso inicial da fêmea, sendo a razão multiplicada pelo percentual de eclosão e por 2000 (DRUMMOND, 1971). O percentual de controle é calculado através da razão entre a diferença da média da eficiência reprodutiva do grupo controle e do grupo tratado e a média da eficiência reprodutiva do grupo controle, sendo a razão multiplicada por 100 (DRUMMOND, 1971).

Tabela 2. Descrição dos grupos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* estabelecidos para o tratamento por imersão em suspensão conidial com os isolados ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* e ARSEF 549 de *M. anisopliae* marcados com *green fluorescence protein* (GFP) ou a cepa selvagem (Wt).

Siglas	Descrição dos grupos
ARSEF 2575 GFP 10⁸	Grupo imerso em suspensão conidial na concentração de 10 ⁸ conídios/mL do isolado ARSEF 2575 marcado com GFP
ARSEF 2575 GFP 10⁷	Grupo imerso em suspensão conidial na concentração de 10 ⁷ conídios/mL do isolado ARSEF 2575 marcado com GFP
ARSEF 2575 wt 10⁸	Grupo imerso em suspensão conidial na concentração de 10 ⁸ conídios/mL do isolado ARSEF 2575 Wt (cepa selvagem)
ARSEF 2575 wt 10⁷	Grupo imerso em suspensão conidial na concentração de 10 ⁷ conídios/mL do isolado ARSEF 2575 Wt
ARSEF 549 GFP 10⁸	Grupo imerso em suspensão conidial na concentração de 10 ⁸ conídios/mL do isolado ARSEF 549 marcado com GFP
ARSEF 549 GFP 10⁷	Grupo imerso em suspensão conidial na concentração de 10 ⁷ conídios/mL do isolado ARSEF 549 marcado com GFP
ARSEF 549 wt 10⁸	Grupo imerso em suspensão conidial na concentração de 10 ⁸ conídios/mL do isolado ARSEF 549 Wt (cepa selvagem)
ARSEF 549 wt 10⁷	Grupo imerso em suspensão conidial na concentração de 10 ⁷ conídios/mL do isolado ARSEF 2575 Wt
CTR	Grupo controle imerso apenas à água destilada estéril com Tween® a 0,1% (v/v)

3.6.2 Tratamento de fêmeas ingurgitadas por inoculação

Para o tratamento por inoculação, as fêmeas foram previamente divididas em dez grupos contendo vinte fêmeas em cada, os grupos estão descritos na tabela 3. Desta forma, as fêmeas foram inoculadas com 5µL de suspensão fúngica no forame localizado entre o capitulo e o escudo dorsal, com o auxílio de microscópio estereoscópio e seringa de insulina (JOHNS, et

al., 1998). Os grupos controles foram inoculados com 5µL de uma solução de água destilada e Tween® a 0,1%. Cada grupo foi realizado em triplicata e repetido duas vezes.

Tabela 3. Descrição dos grupos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* estabelecidos para o tratamento por inoculação com os isolados ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* e ARSEF 549 de *M. anisopliae* marcados com *green fluorescence protein* (GFP) ou a cepa selvagem (Wt).

Siglas	Descrição dos grupos
ARSEF 2575 GFP 24h	Grupo inoculado com o isolado ARSEF 2575 marcado com GFP onde a coleta de hemolinfa foi realizada 24 horas após a infecção.
ARSEF 2575 wt 24h	Grupo ARSEF 2575 Wt (cepa selvagem), onde a coleta de hemolinfa foi realizada 24 horas após a infecção.
ARSEF 549 GFP 24h	Grupo inoculado com o isolado ARSEF 549 marcado com GFP, onde a coleta de hemolinfa foi realizada 24 horas após a infecção.
ARSEF 549 wt 24h	Grupo inoculado com o isolado ARSEF 549 Wt (cepa selvagem), onde a coleta de hemolinfa foi realizada 24 horas após a infecção.
CTR 24h	Grupo controle de fêmeas ingurgitadas que não recebeu nenhum tratamento e onde a coleta de hemolinfa foi realizada 24 horas após.
ARSEF 2575 GFP 48h	Grupo inoculado com o isolado ARSEF 2575 marcado com GFP onde a coleta de hemolinfa foi realizada 48 horas após a infecção.
ARSEF 2575 wt 48h	Grupo inoculado com o isolado ARSEF 2575 Wt (cepa selvagem), onde a coleta de hemolinfa foi realizada 48 horas após a infecção.
ARSEF 549 GFP 48h	Grupo inoculado com o isolado ARSEF 549 marcado com GFP, onde a coleta de hemolinfa foi realizada 48 horas após a infecção.
ARSEF 549 wt 48h	Grupo inoculado com o isolado ARSEF 549 Wt (cepa selvagem), onde a coleta de hemolinfa foi realizada 48 horas após a infecção.
CTR 48h	Grupo controle de fêmeas ingurgitadas que não recebeu nenhum tratamento e onde a coleta de hemolinfa foi realizada 48 horas após.

3.6.2.1 Coleta da hemolinfa

A coleta da hemolinfa foi realizada de acordo com a metodologia de Angelo et al., 2010 no item 3.3.1. Após a coleta de hemolinfa, esta foi centrifugada a $500 \times g$ durante três minutos a 4°C e os hemócitos foram separados do plasma e ressuspensos em 20 mL de PBS (tampão fosfato 0,1M, NaCl 1.5 M, pH 7.4).

3.6.2.2 Quantificação dos hemócitos totais de fêmeas ingurgitadas

A quantificação dos hemócitos foi realizada nos grupos expostos aos fungos e seus respectivos grupos controle. Após a sua ressuspensão em 20 μL de tampão fosfato pH 7,4 com auxílio de Câmara de Neubauer e microscópio óptico, adaptando a metodologia empregada por Alves (1998).

3.6.2.3 Identificação dos tipos celulares por microscopia de luz convencional

Para a identificação dos hemócitos foi utilizada a hemolinfa das mesmas fêmeas da contagem total do número de hemócitos. Tal identificação foi realizada através de um esfregaço a partir da secção da região distal do tarso de uma ou mais patas e da leve pressão sobre o corpo, com auxílio de tesoura e pinça oftálmica (BURGDORFER, 1970) e através de esfregaço entre lâmina e lamínula. Após a coleta em lâminas, a gota de hemolinfa foi seca ao ar, fixada em álcool metílico (P.A.), por 3 minutos e deixada em corante de Giemsa (proporção de 1:9 de solução Tampão Sorensen, pH 7,2) por 30 minutos. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de corante, secas ao ar e avaliadas sob microscópio óptico $40 \times$ (SILVA, 2006). Também foi realizada a coloração por Ácido Periódico de Schiff (PAS) para melhor diferenciação dos tipos celulares. Para a identificação foram utilizadas 5 lâminas por grupo.

3.6.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a microscopia eletrônica de transmissão foi escolhido apenas um isolado fúngico (ARSEF 2575-cepa selvagem, já que a marcação molecular não influenciou na virulência dos fungos e o isolado 2575 é utilizado como um padrão para diversos testes) e um grupo controle que foi inoculado apenas com água destilada e Tween® a 0,1% (v/v). Cada grupo era composto por 20 fêmeas e o experimento foi realizado em duplicata.

As células foram ressuspensas em fixador glutaraldeído a 2% (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão cacodilato 0,1 M (Sigma-Aldrich, EUA), pH 7.2, overnight (BRAYNER et al., 2005). As células em suspensão foram lavadas em solução de sucrose em 0,2 M tampão cacodilato pH 7.2 e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão cacodilato. Depois realizou-se a desidratação, com soluções de acetona a 30%, 50%, 70%, 90% e três séries de 100%. As amostras foram embebidas em resina EPON e os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila (Sigma), e identificados por microscópio eletrônico de transmissão Jeol 100 CX II.

Em condições fisiológicas normais ou quando desafiados por patógenos é difícil encontrar um sólido e confiável critério de classificação para os hemócitos de *R. microplus*. Seguem abaixo as características usadas como critério para classificação dos tipos de hemócitos.

- 1- Grânulos: a presença ou ausência, tamanho, formato e a estrutura dos grânulos foram as características mais evidentes nos hemócitos. Foram identificadas três variações granulares (1) grânulos eletrondensos, em sua maioria de formato circular, (2) pequenos grânulos eletróluscentes e (3) grânulo de formato tubular.
- 2- Formato da célula: as células variaram de um formato circular a um formato ovalado.
- 3- Pseudópodes: Extensões proeminentes da membrana plasmática foram observadas nas superfícies de alguns tipos celulares. O número de projeções, o tamanho e o formato dessas foram usados para distinguir os tipos de hemócitos.
- 4- Núcleo: foram analisados o formato e localização do núcleo assim como a relação de tamanho entre o núcleo e o citoplasma.
- 5- Atividade endocítica: a atividade endocítica foi determinada em alguns hemócitos através de lisossomos primários e secundários.
- 6- Outras organelas celulares: as células também se diferenciam pela presença ou ausência de retículo endoplasmático rugoso.
- 7- Homogeneidade do citoplasma.

Para melhor visualização dos hemócitos de *Rhipicephalus microplus*, foram desenvolvidos desenhos esquemáticos utilizando o programa CorelDRAW Graphics Suite 2017.

3.7 Análise Estatística

A estatística dos parâmetros biológicos e a contagem de hemócitos foi realizada a partir do programa BioEstat 5.3 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá –Tefé – AM),. Foi realizado um teste de normalidade (Shapiro-Wilk), sendo os dados não paramétricos avaliados pelo teste de Kruskal Wallis seguido de Student-Newman-Keuls (SNK) (comparação entre as ordenações médias) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.2. Padronização da técnica de separação dos hemócitos

Para a padronização da técnica, cinco protocolos diferentes foram testados. Neste experimento foi observado que a velocidade e o tempo de centrifugação bem como a temperatura, influenciaram na deposição celular das amostras no fundo do microtubo (Figura 1). Dois protocolos foram considerados as melhores opções para a coleta de hemócitos de *Rhipicephalus microplus*, foram: protocolo 1 (centrifugação de $500 \times g$ por 3 minutos a $4^\circ C$) e protocolo 5 (sedimentação a $8^\circ C$ durante 24 horas). No protocolo 1, um sedimento leve foi formado no microtubo (Figura 1A) e poucos grânulos devido ao rompimento celular foram observados (Figura 2A). Como segunda possibilidade, a sedimentação das amostras durante 24h a $8^\circ C$ resultou em um sedimento mais suave (Figura 1E) com ressuspensão fácil e pequena degranulação celular (Figura 2E).

Os outros protocolos apresentaram algumas limitações, quando as amostras foram centrifugadas. No protocolo 2, o sedimento formado foi espesso (Figura 1B), mais condensado e de difícil ressuspensão, mostrando muitos grânulos (Figura 2B). Quando a velocidade foi aumentada no protocolo 3, o sedimento era ainda espesso (Figura 1C) e a ressuspensão no tampão PBS só era possível usando uma ponta de pipeta, causando uma ruptura intensiva das células (alta degranulação) e, conseqüentemente, levando a um número de células reduzidas (Figura 2C). O protocolo 4 não foi suficiente para a formação do sedimento (Figura 1D), tornando impossível a quantificação e a análise dos hemócitos (Figura 2D).

Os protocolos 1 e 4 foram considerados os mais efetivos, apresentando mais células intactas (Figura 3) e menor degranulação celular, mesmo que a centrifugação a $500 \times g$ por três minutos a $4^\circ C$ tenha apresentado um número maior de células (média de $6,3 \times 10^6$ hemócitos/ μL) na contagem em câmara de Neubauer (Figura 4).

A concentração de hemócitos variou de 1,8 (protocolo 2) a $6,3 \times 10^6$ hemócitos/mL (protocolo 1) (Figura 4). Além de resultar em poucas células não íntegras, a centrifugação a $500 \times g$ durante 3 min a $4^\circ C$ gerou uma maior concentração de células ($6,3 \times 10^6$ hemócitos/mL). Embora a sedimentação em 24hs também tenha mostrado alta concentração de células ($5,8 \times 10^6$ hemócitos mL⁻¹), as amostras ressuspensas ficaram turvas, sugerindo contaminação bacteriana.

A porcentagem de células não viáveis após a impregnação com azul de Tripán (Prolab) foi menor para o protocolo 1 (5,6%), seguido de sedimentação por 24hs (10%) (Figura 3). Como esperado, nos protocolos 2 (23,8%) e 3 (16%), o tempo de centrifugação mais longo e as diferentes forças de centrifugação (300 ou 5040 × g) resultou em um maior número de células não viáveis e possivelmente um maior aumento de degranulação celular.

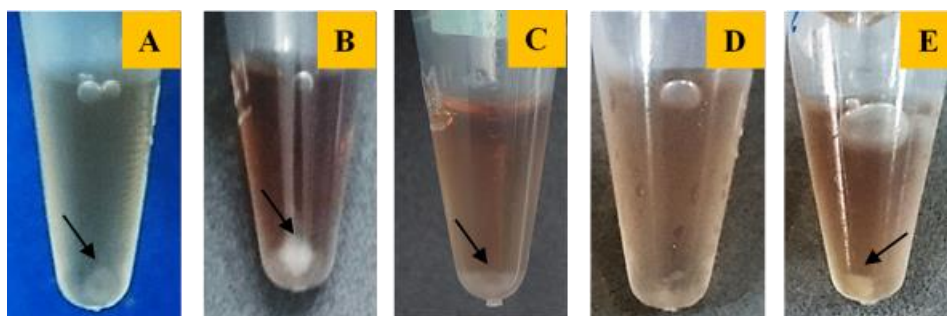


Figura 1. Amostras de hemolinfa de *Rhipicephalus microplus* após diferentes protocolos de centrifugação / sedimentação. (A) Protocolo 1: centrifugação a $500 \times g$ durante 3 min a $4^\circ C$ (B) Protocolo 2: centrifugação a $300 \times g$ durante 10 min a $4^\circ C$; (C) Protocolo 3: centrifugação a $5040 \times g$ durante 10 minutos a $4^\circ C$; (D) Protocolo 4: sedimentação por 12h a $8^\circ C$ e, (E) Protocolo 5: sedimentação por 24h a $8^\circ C$. A sedimentação celular está indicada pela seta preta.

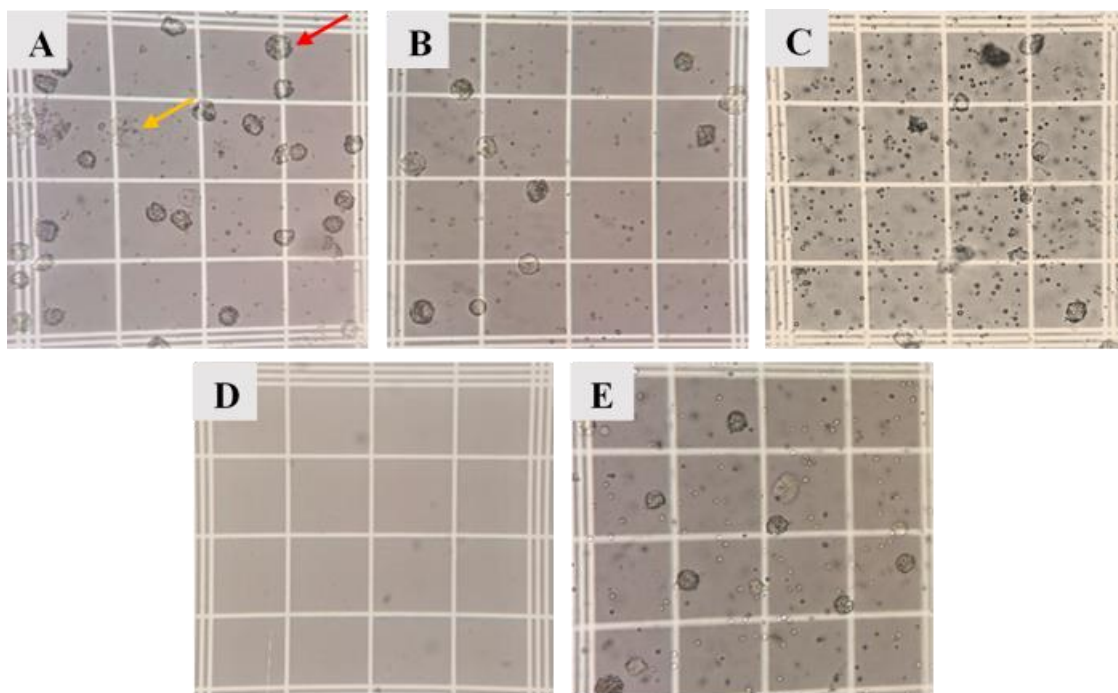


Figura 2. Hemócitos de *Rhipicephalus microplus* visualizados em câmara de Neubauer ($20 \times$) obtidos a partir de diferentes protocolos de centrifugação da hemolinfa. (A) centrifugação a $500 \times g$ durante 3 minutos a $4^\circ C$. (B) centrifugação a $300 \times g$ durante 10 minutos a $4^\circ C$. (C) centrifugação a $5040 \times g$ durante 10 minutos a $4^\circ C$. (D) sedimentação durante 24 horas a $8^\circ C$. Hemócitos estão identificados pela seta vermelha e grânulos representados pela seta amarela.

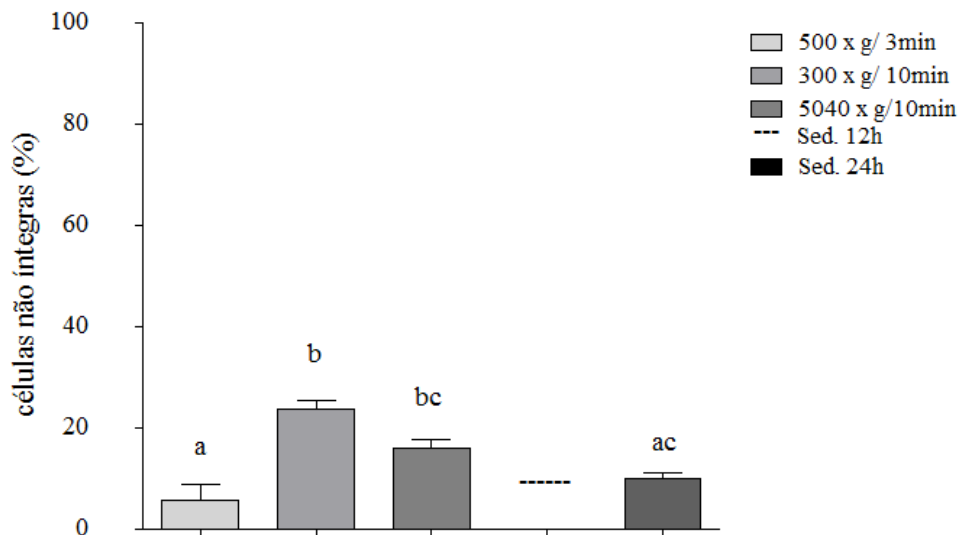


Figura 3. Percentual de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* não viáveis após cada protocolo. As células impregnadas com azul de Tripán foram consideradas não viáveis. Os valores médios (\pm DP) seguidos para a mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($P \geq 0,05$). (-) Não houve visualização do sedimento. Um total de 300 células foram contadas em cada protocolo. Os experimentos foram repetidos três vezes.

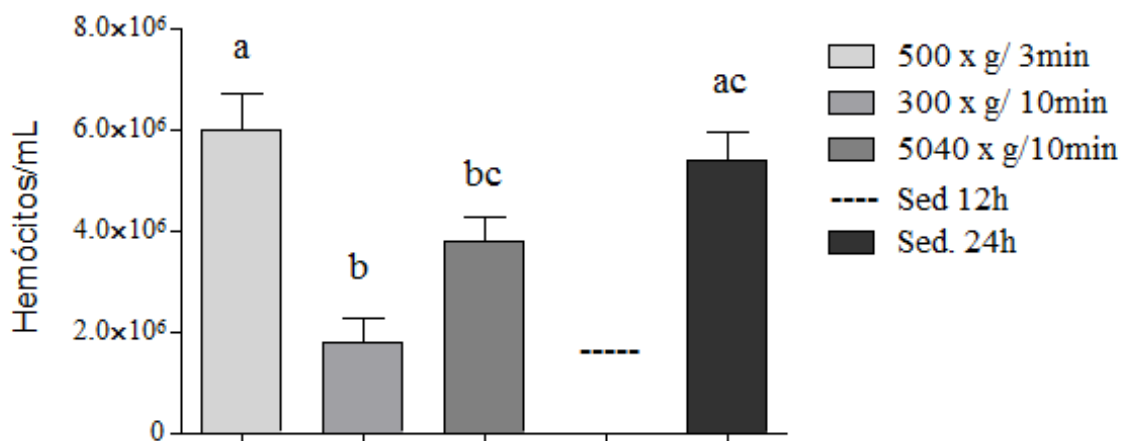


Figura 4. Concentração de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* obtida após ressuspensão em tampão fosfato. Os valores médios (\pm DP) seguidos para a mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($P \geq 0,05$). (-) A sedimentação não ocorreu após o processamento. Os experimentos foram repetidos três vezes.

4.1 Bioensaio com fêmeas ingurgitadas

Todas as suspensões fúngicas utilizadas no tratamento das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* apresentaram conídios viáveis (ou seja, > 98% de germinação dos conídios) 24 horas após a inoculação em BDA em condições controladas (27 ° C, RH ≥ 80%). Todos os parâmetros biológicos analisados são relatados na Tabela 4. A exposição das fêmeas por imersão usando isolados da cepa selvagem de ARSEF 2575 e ARSEF 549 na concentração de 10⁸ foi efetiva para controlar as fêmeas de *R. microplus*, reduzindo a o peso da massa total de ovos em aproximadamente 22 e 28%, respectivamente, em comparação com o grupo controle (não exposto a fungos) (Tabela 1). O isolado de ARSEF 2575 GFP em 10⁸ conídios / mL reduziu o período de incubação dos ovos de fêmeas expostas em quase 23% em relação ao grupo controle e foi estatisticamente semelhante à cepa de tipo selvagem do mesmo isolado fúngico. Quanto à porcentagem de controle das fêmeas, a cepa selvagem do isolado ARSEF 2575 também obteve melhores resultados, atingindo aproximadamente 38% (Tabela 1).

A cepa selvagem de ARSEF 2575 na concentração de 10⁸ conídios/mL foi capaz de reduzir 22% do índice de produção de ovos e a cepa selvagem de ARSEF 549 na mesma concentração reduziu este índice em 28% em comparação com o grupo controle. O índice nutricional também foi reduzido em 22% e 29% quando ARSEF 2575 Wt e ARSEF 549 Wt foram utilizados, respectivamente. Conseqüentemente, os resultados de ARSEF 2575 Wt e GFP e ARSEF 549 Wt e GFP nas mesmas concentrações foram muito semelhantes entre si, demonstrando que a marcação molecular GFP não influenciou na ação dos fungos contra *R. microplus* quando os parâmetros biológicos são avaliados. A eficácia de exposição *in vitro* dos isolados testados foi considerada fraca devido às menores porcentagens de controle (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito sobre os parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após imersão em suspensões de *Metarhizium* spp ou 0,1% Tween® 80. Peso Inicial da Fêmea (P. I. F.), Peso Total da Massa de Ovos (P. T. M. O.), Percentual de Eclosão (PE), Índice de Produção de Ovos (I. P. O.), Índice Nutricional (I. N.) e Percentual de Controle (% Controle).

Grupo	P. I. F. (g)	P. T. M. O.(g)	P.E	I. P. O.	I. N.	% Controle
CTR	0.2167± 0.0183a	0.1319± 0.0154a	96.50±1.93a	60.75± 3.06a	74.98± 5.46a	-
ARSEF 2575 GFP 10 ⁸	0.2158± 0.0180a	0.1027± 0.0250bc	74.37±17.92a	47.42± 10.96bc	58.30± 12.03bc	38.74
ARSEF 2575 GFP 10 ⁷	0.2177± 0.0171a	0.1217± 0.0080ac	89.25±9.02a	56.16± 4.76ac	64.02± 5.08b	14.20
ARSEF 2575 WT 10 ⁸	0.2180± 0.0183a	0.1115± 0.0176bc	80.62±25.54a	51.39± 8.27bc	58.90± 8.84bc	30.00
ARSEF 2575 WT 10 ⁷	0.2171± 0.0176a	0.1205± 0.0137ac	84.12±15.04a	55.61± 5.64ac	63.08± 5.59b	19.64
ARSEF 549 GFP 10 ⁸	0.2168± 0.0181a	0.0943± 0.0201b	85.62±14.88a	43.60± 8.43b	52.68± 8.22c	35.40
ARSEF 549 GFP 10 ⁷	0.2222± 0.0192a	0.1129± 0.0109bc	91.66±5.52a	50.99± 4.71bc	63.71±5.80b	20.02
ARSEF 549 WT 10 ⁸	0.2158± 0.0188a	0.1097± 0.0143bc	93.37±6.14a	50.78± 4.25bc	59.87±3.42bc	18.83
ARSEF 549 WT 10 ⁷	0.2153± 0.0202a	0.1187± 0.0124ac	86.71±16.97a	55.31± 5.11ac	65.16±8.54b	17.11

(*) Detalhes sobre os tratamentos / grupos estão descritos no texto. Os experimentos foram conduzidos a 27 ° C e umidade relativa > 80%. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($P>0,05$). Os resultados foram avaliados usando Kruskal-wallis seguido de SNK para dados não-paramétricos. O ensaio biológico foi repetido duas vezes.

4.3 Tratamento de fêmeas ingurgitadas por inoculação

4.3.1. Quantificação dos hemócitos

A quantificação dos hemócitos foi realizada em câmara de Neubauer e foi possível observar que após 24 horas de tratamento, os isolados fúngicos usados foram capazes de reduzir a concentração do número de hemócitos em até 86% quando comparados com o grupo controle. Ainda, foi possível observar que não houve divergência entre as cepas selvagens e as cepas com marcação molecular, demonstrando que esta modificação genética não atrapalha na performance do fungo. Após 48 horas não foi possível coletar a hemolinfa das fêmeas ingurgitadas inoculadas com *Metarhizium* spp, pois estas já se encontravam hemolisadas, contaminando assim as amostras de hemolinfa.

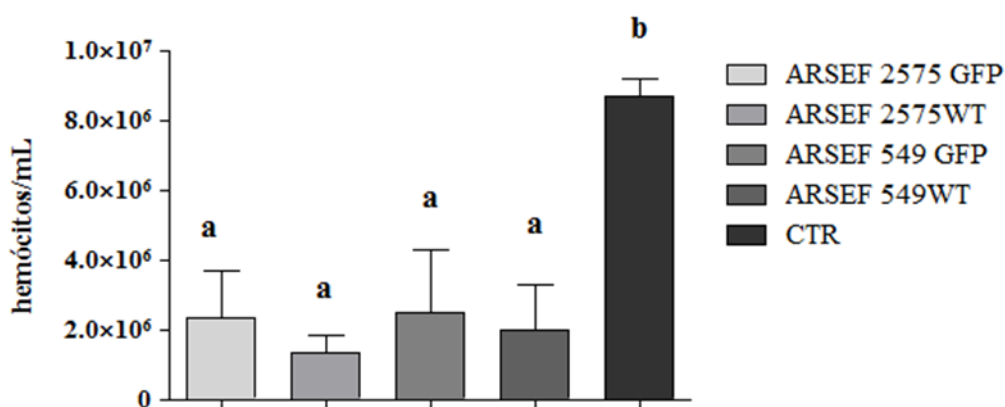


Figura 5. Concentração de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* 24 horas após a inoculação de *Metarhizium* spp. Os valores médios seguidos para a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($P \geq 0,05$).

4.3.2 Identificação dos tipos celulares

Através de microscopia de luz, foi possível observar 5 tipos celulares (pró-hemócitos, esferulócitos, granulócitos, plasmatócitos e oenocitóides) em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em condições fisiológicas normais. Através de coloração por Giemsa foi demonstrado a disposição do corante no núcleo e no citoplasma, todas as células apresentavam o núcleo basófilo e apresentaram as seguintes características: os granulócitos como células circulares e se apresentavam de duas maneiras diferentes, uma com o núcleo mais central (Figura 6B) e outra com o núcleo mais excêntrico (Figura 6C). Os plasmatócitos se apresentaram com formato variado, com núcleo deslocado da região central e alguns

apresentavam pseudópodes (Figura 6D). Os oenocitóides foram células encontradas de um tamanho maior, com núcleo deslocado (6E) e os pró-hemócitos foram células relativamente pequenas, com o núcleo bem desenvolvido em relação ao citoplasma (Figura 6A). Em relação à coloração por PAS, também foi possível observar dois tipos de granulócitos, um com núcleo mais central e outro com núcleo excêntrico (Figura 7A e 7B). Os plasmatócitos apresentaram formato irregular, citoplasma com algumas vesículas e possivelmente material granular corado com coloração magenta (Figura 7C e 7D). Os oenocitóides eram células grandes, com núcleo deslocado do centro (Figura 7E). Os pró-hemócitos não foram visualizados nesta coloração e os esferulócitos são células de formato circular a oval com esferas de coloração rósea no citoplasma (Figura 7F), foram visualizados apenas na coloração de PAS, em Giemsa as características foram muito semelhantes às apresentadas pelos granulócitos, o que deixou a caracterização mais difícil.

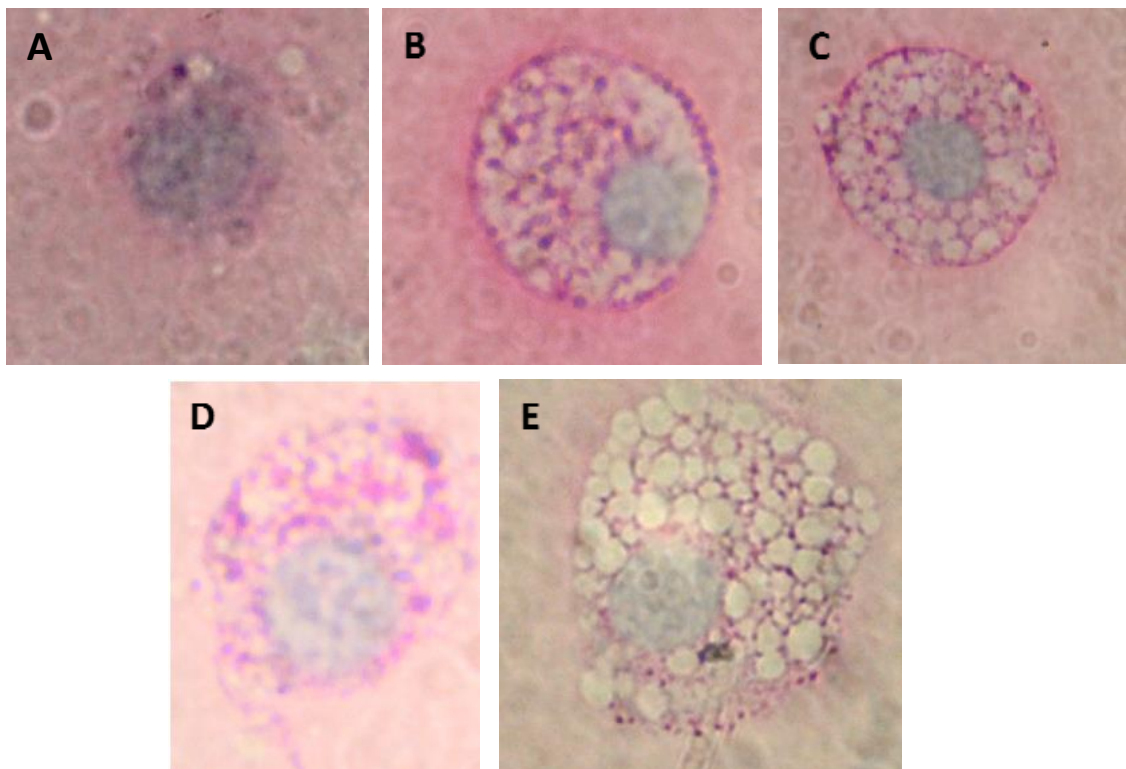


Figura 6. Representação de alguns dos tipos celulares encontrados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus. microplus*, em condições fisiológicas normais, através de coloração por Giemsa. (A) Pró-hemócito, (B e C) Granulócito, (D) Plasmatócito apresentando pseudópode e (E) Oenocitóide.

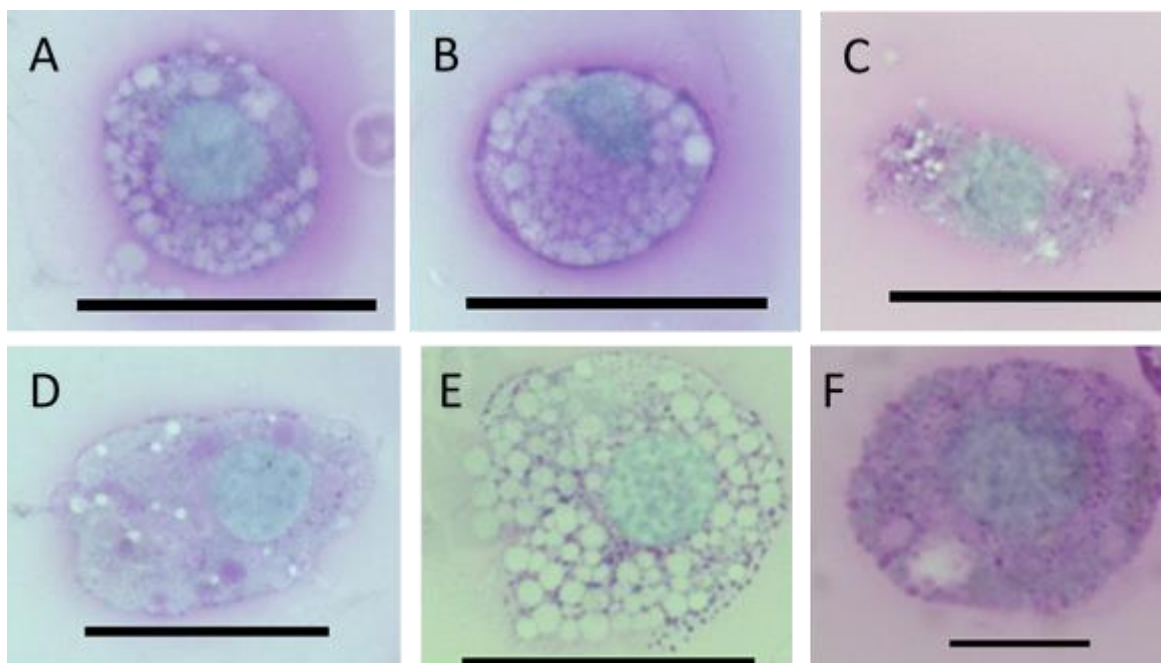


Figura 7. Tipos celulares encontrados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, em condições fisiológicas normais, através de coloração por *Periodic acid-Schiff* (PAS). (A,B) Granulócitos, (C,D) plasmatócitos, (E) oenocitóide e (F) esferulócito. Barras (A-E) : 30 μm e (F): 10 μm .

3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

De acordo com as especificações da presença ou ausência de grânulos, formato da célula, presença ou ausência de pseudópodes, disposição do núcleo, atividade endocítica, retículo endoplasmático e homogeneidade do citoplasma; as células puderam ser classificadas da seguinte maneira:

Esferulócitos: células grandes (medindo aproximadamente 12-15 μm), apresentando esférulas ocupando praticamente todo o citoplasma e com eletrondensidades homogêneas (Figura 8 A e 8B)

Pró-hemócitos: células pequenas (variando de 6 a 7 μm), de formato circular ou até mesmo ovalado, com o núcleo ocupando grande parte da célula. O citoplasma é homogêneo, rico em mitocôndrias e poucas inclusões granulares (Figura 9 A e 9B). As células também

foram demonstradas em cortes semi-finos de microscopia eletrônica (Figura 12), também sendo demonstrado a presença de um núcleo ocupando grande parte do citoplasma da célula (Figura 13 F).

Granulócitos: células circulares, medindo aproximadamente 9 μm , podem apresentar pontos de invaginação na membrana plasmática, possuem poucos vacúolos ou nenhum, apresentam grande quantidade de grânulos (Figura 13B e 13C) eletrondensos, o núcleo levemente deslocado ou excêntrico ou podem também apresentar núcleo central (Figura 9C, 9D, 10 A, 10B, 10C e 10D).

Plasmatócitos: células fagocíticas, possuem grande quantidade de lisossomos, são células grandes (aproximadamente 11 μm), geralmente não apresentam inclusões granulares, mas algumas células foram observadas com uma leve granulação no citoplasma. Possuem vacúolos em tamanho moderado (Figura 11 A, 11B, 11C e 11D) e podem apresentar pseudópodes (Figura 10C, 12D e 12E).

Os oenocitóides foram visualizados apenas nos cortes semifinos de microscopia eletrônica, já que são células pouco abundantes. Aparentemente são células muito grandes e apresentam grandes vacuolizações em seu citoplasma, são diferente dos granulócitos por apresentarem células em formato de mórula com grandes inclusões acidofílicas ou basofílicas (Figura 13 A).

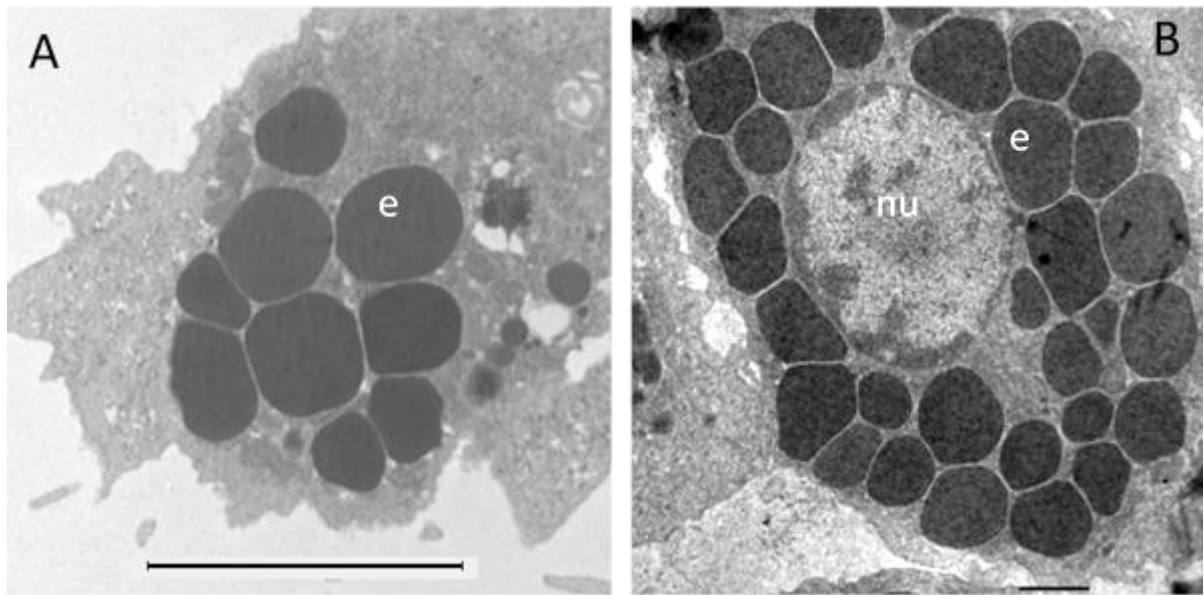


Figura 8. Eletromicrografias de esferulócios de *Rhipicephalus microplus* (A, B), apresentando esférulas de diversos formatos e tamanhos (e) e apresentando núcleo (nu). Barra = 5 μm (A) e barra = 2 μm (B).

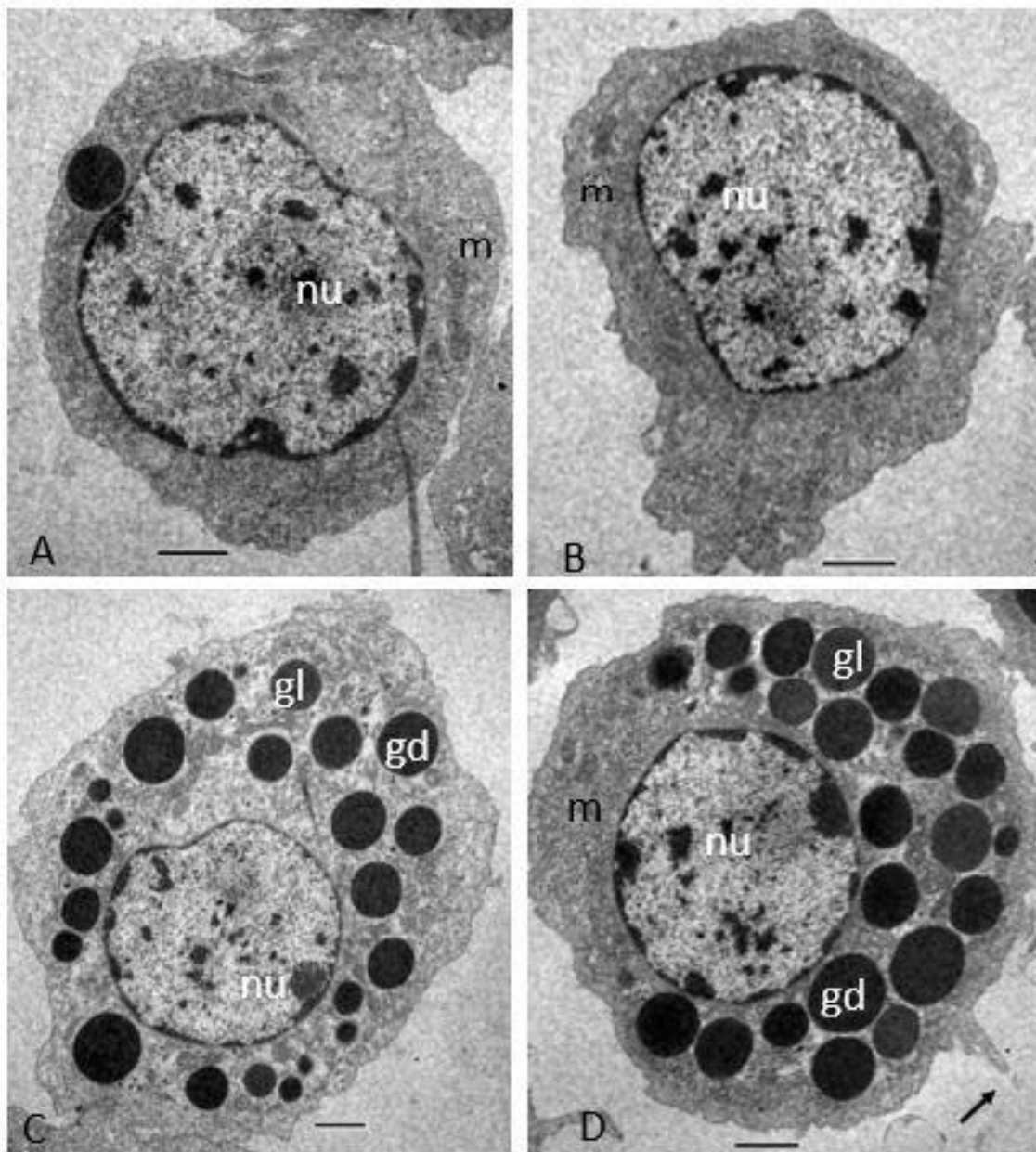


Figura 9. Eletromicrografias de (A,B) pró- hemócitos de *Rhipicephalus microplus* e (C,D) granulócitos; pró-hemócitos apresentando citoplasma homogêneo, núcleo (nu), algumas mitocôndrias (m) e pouco ou nenhum grânulo eletrondenso (gd); Granulócitos apresentando núcleo (nu), grânulos eletrondensos (gd), grânulos eletronluscetes (gl), algumas mitocôndrias (m) e projeções da membrana plasmática (seta preta). Barra= 2 μ m.

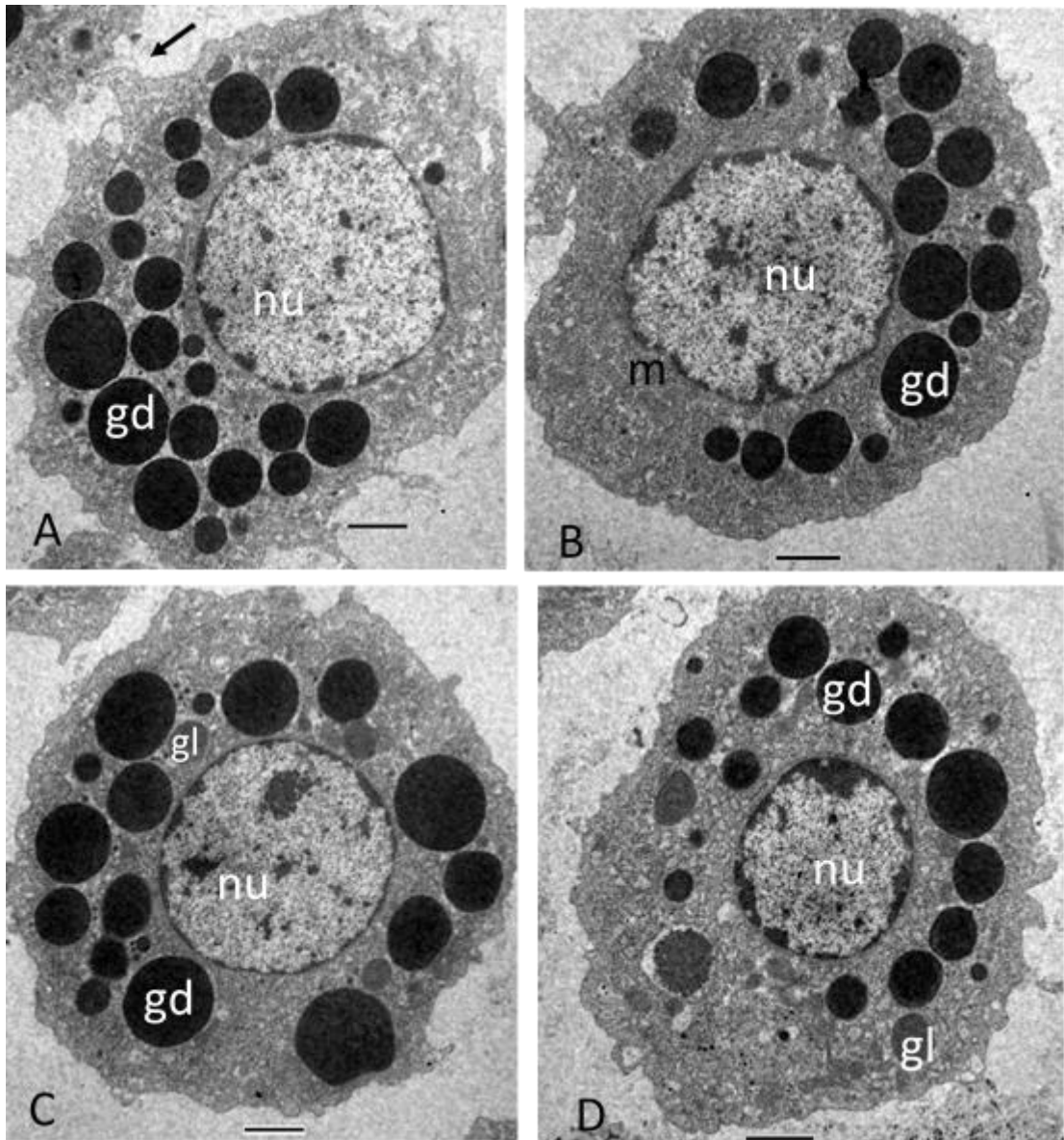


Figura 10. Eletromicrografias de granulócitos de *Rhipicephalus microplus* (A, B, C, D); Granulócitos apresentando núcleo (nu), grânulos eletrondensos (gd), algumas mitocôndrias (m) e projeções da membrana plasmática (seta preta) e grânulos eletróluscentes (gl). Barra = 2 μ m.

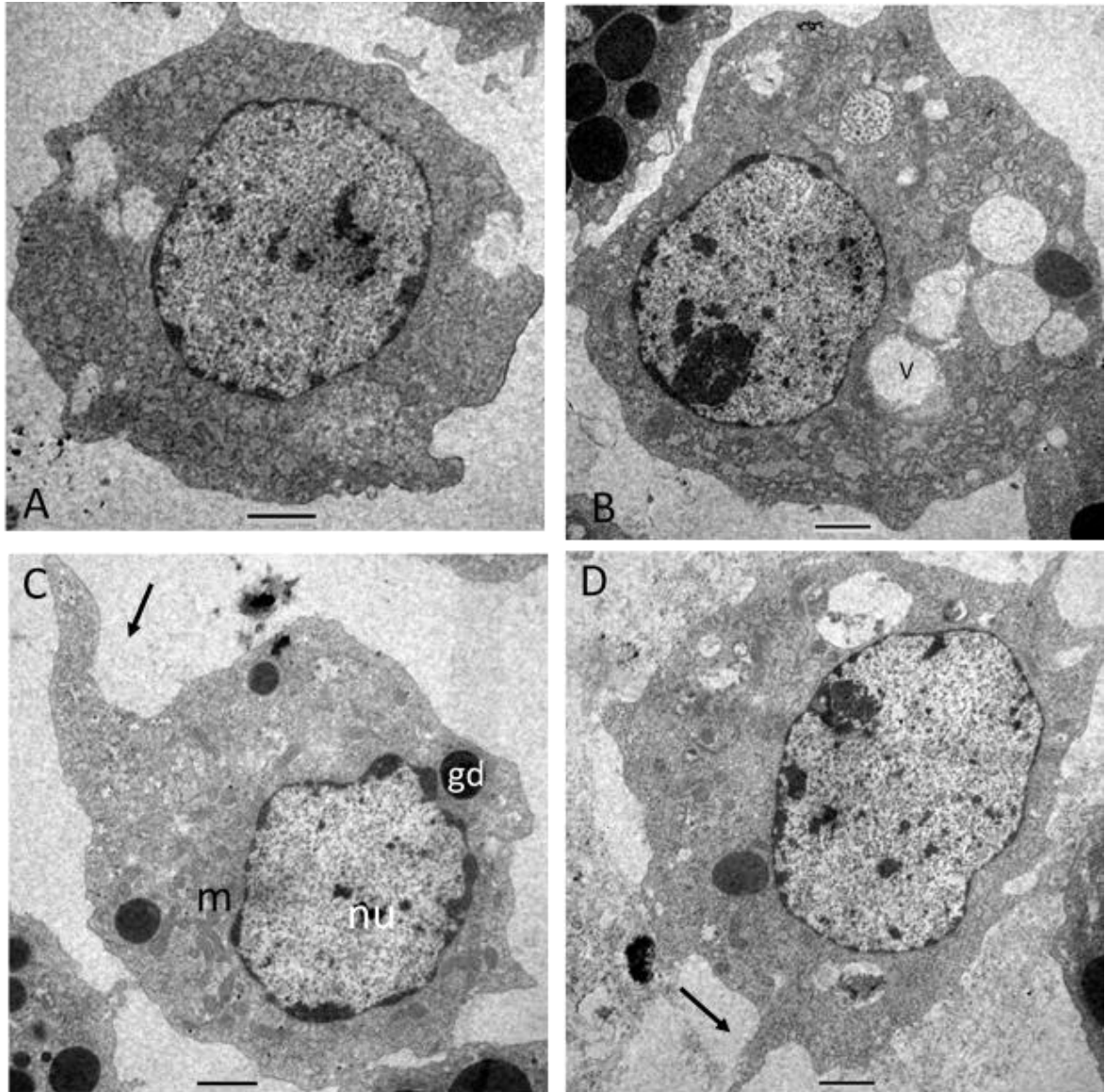


Figura 11. Eletromicrografias de plasmatócitos de *Rhipicephalus microplus* (A, B, C, D); plasmatócitos apresentando núcleo (nu), alguns apresentando poucos grânulos eletrondensos (gd) e eletronluscentes (gl), numerosas mitocôndrias (m), vacúolos (v) e pseudópodes (seta preta). Barra = 2 μ m.

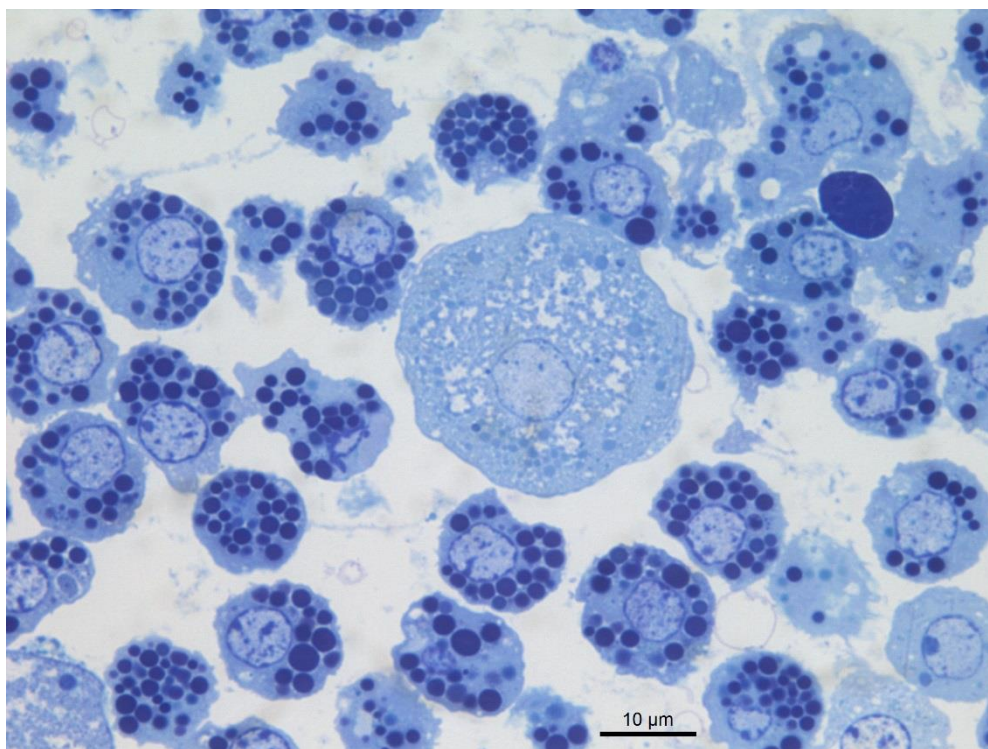


Figura 12. Corte semi-finos de microscopia eletrônica de transmissão de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* corados com azul de Toluidina. Barra = 10 μm .

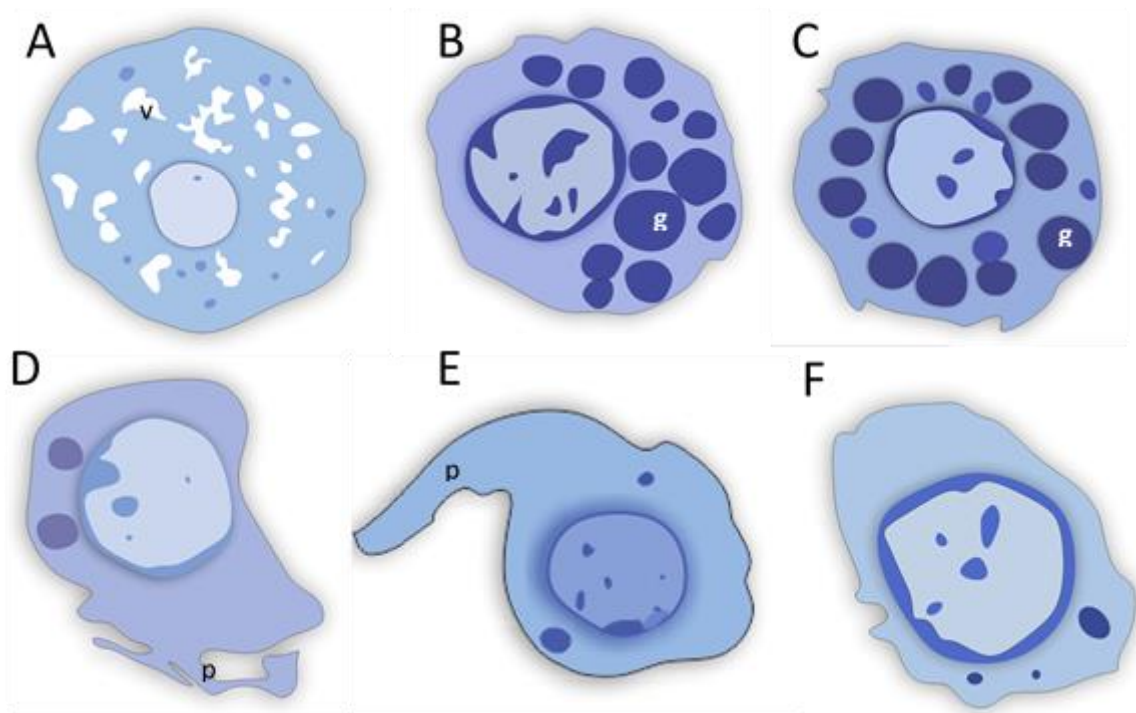


Figura 13. Desenho esquemático das células de *Rhipicephalus microplus*. (A) Oenocitóide, (B,C) granulócito, (D,E) plasmatócito, (F) pró-hemócito. v= vacúolo, g= grânulo e p=pseudópode.

Algumas mudanças morfológicas foram encontradas em hemócitos de *R. microplus* após a infecção fúngica. Primeiramente, não foram observados pró-hemócitos; os granulócitos se apresentavam com perda do contorno celular, menor quantidade de grânulos e presença de lisossomos secundários (Figura 14A, 18D e 29 E). Essas células também apresentavam grande quantidade de retículo endoplasmático (Figura 16 B) e grânulos de formato diferente (Figura 17 A e 17C). Os plasmatócitos se apresentavam como células com grande presença de vacúolos (Figura 18A – C e 19 A- D) e lisossomos secundários (Figura 14B, 14C, 16 A e 17B), também possuíam grande quantidade de mitocôndrias em proximidade com os lisossomos tardios (Figura 14D). Alguns plasmatócitos apresentavam a heterocromatina do núcleo condensada (Figura 15A) e mais grânulos que os plasmatócitos em condições fisiológicas (16 C e 16 D). Ainda, nos plasmatócitos foram observadas estruturas fúngicas com dupla membrana (Figura 15B e 15C) no citoplasma da célula, em fagossomo, sugerindo um processo de fagocitose (Figura 15 D e 15 E) e processos não identificados que podem ser sugestivos de autofagia (16E e 17D).

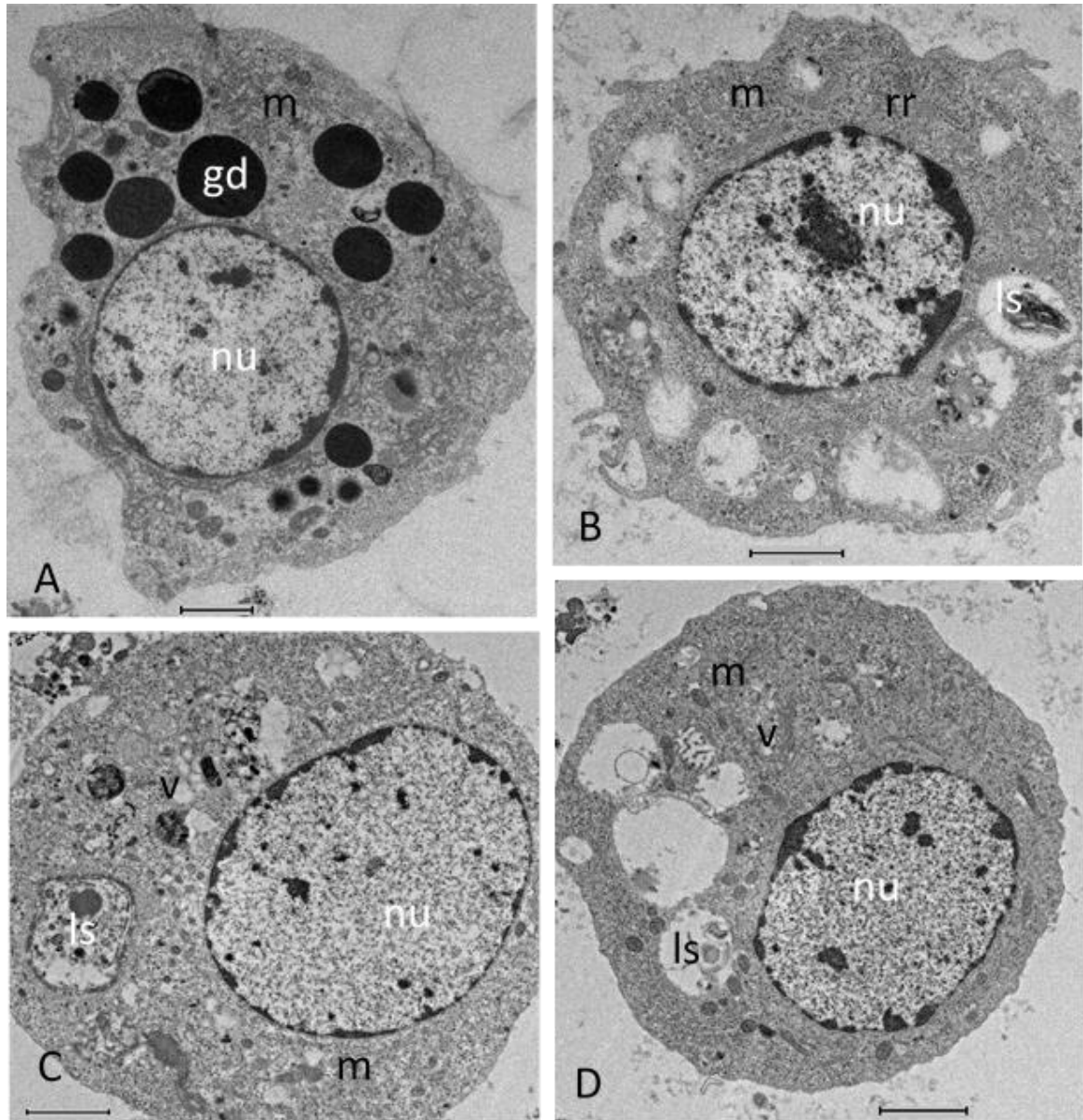


Figura 14. Eletromicrografia de granulócito e plasmatócitos de *Rhipicephalus microplus* após a infecção por *Metarhizium* spp. (A) Granulócito apresentando núcleo (nu), algumas mitocôndrias (m), grânulos eletrodensos (gd) e deformação em seu contorno celular; (B,C) plasmatócitos apresentando núcleo (nu), lisossomos secundários (ls), mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático rugoso (rr); (D) plasmatócitos apresentando núcleo (nu), lisossomos secundários (ls), vacúolos (v) e a presença de mitocôndrias (m) em proximidade com os lisossomos. Barras = 2 μ m.

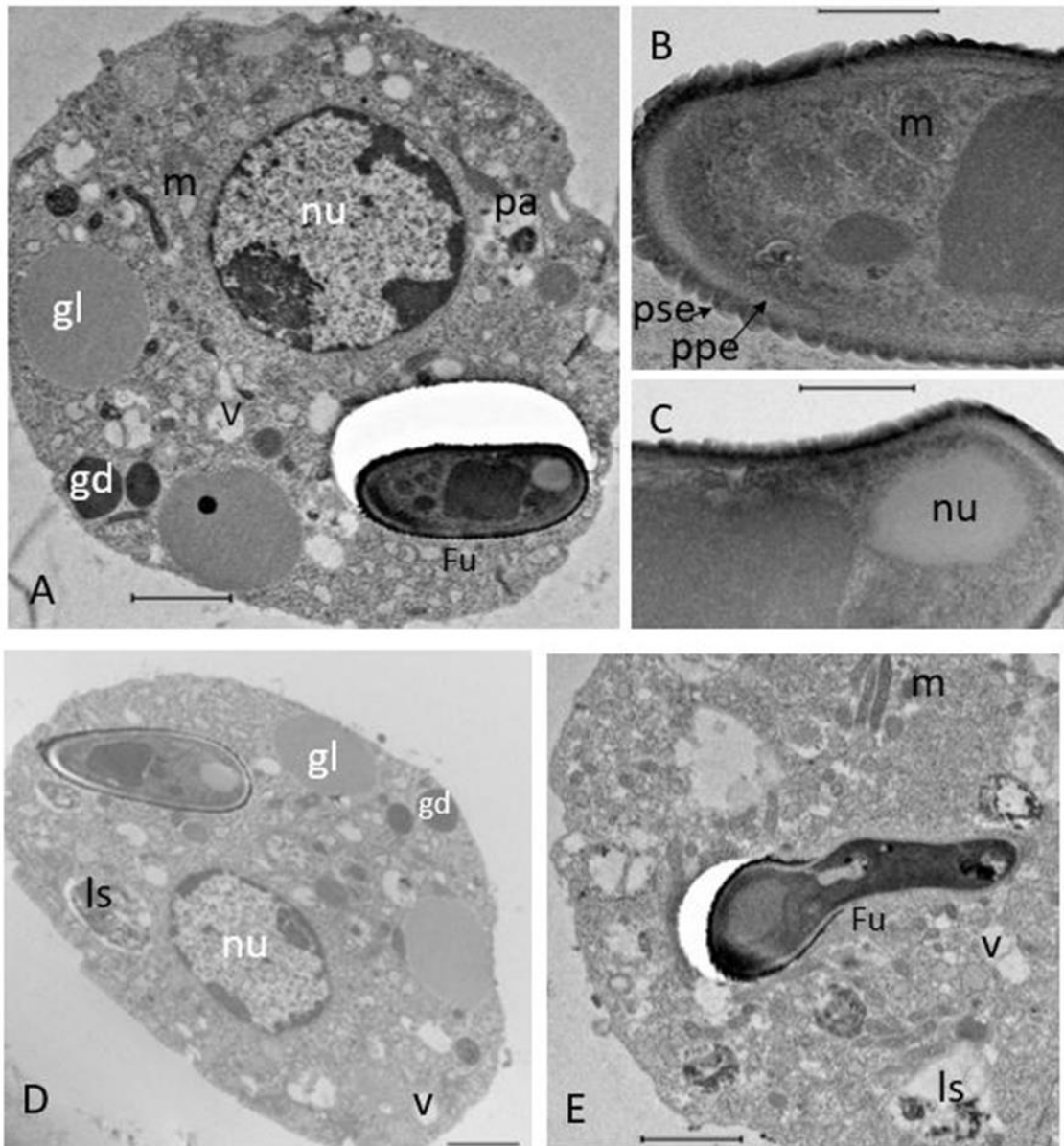


Figura 15. Eletromicrografia de plasmatócitos de *Rhipicephalus microplus* após a infecção e estruturas fúngicas de *Metarhizium* spp. (A) Plasmatócito apresentando núcleo (nu), grânulos eletrodensos (gd) e eletroluscentes (gl), vacúolos, invaginações da membrana plasmática, possível fagossomo com a estrutura fúngica (Fu), processo não identificado (pa) barra = 2 μ m; (B) estrutura fúngica apresentando dupla membrana, uma parede primária do esporo (ppe) e uma parede secundária do esporo (pse) e mitocôndria (m), barra = 500nm; (C) Estrutura fúngica apresentando parede dupla e núcleo (nu), barra = 500nm; (D) Plasmatócito apresentando núcleo (nu), grânulos eletrodensos(gd) e eletroluscentes (gl), lisossomos secundário (ls) e vacúolos(v), barra = 2 μ m; (E) Plasmatócito apresentando lisossomos secundários (ls), mitocôndrias(m), vacúolos (v) e possível fagossomo com estrutura fúngica germinada (Fu), barra = 2 μ m.

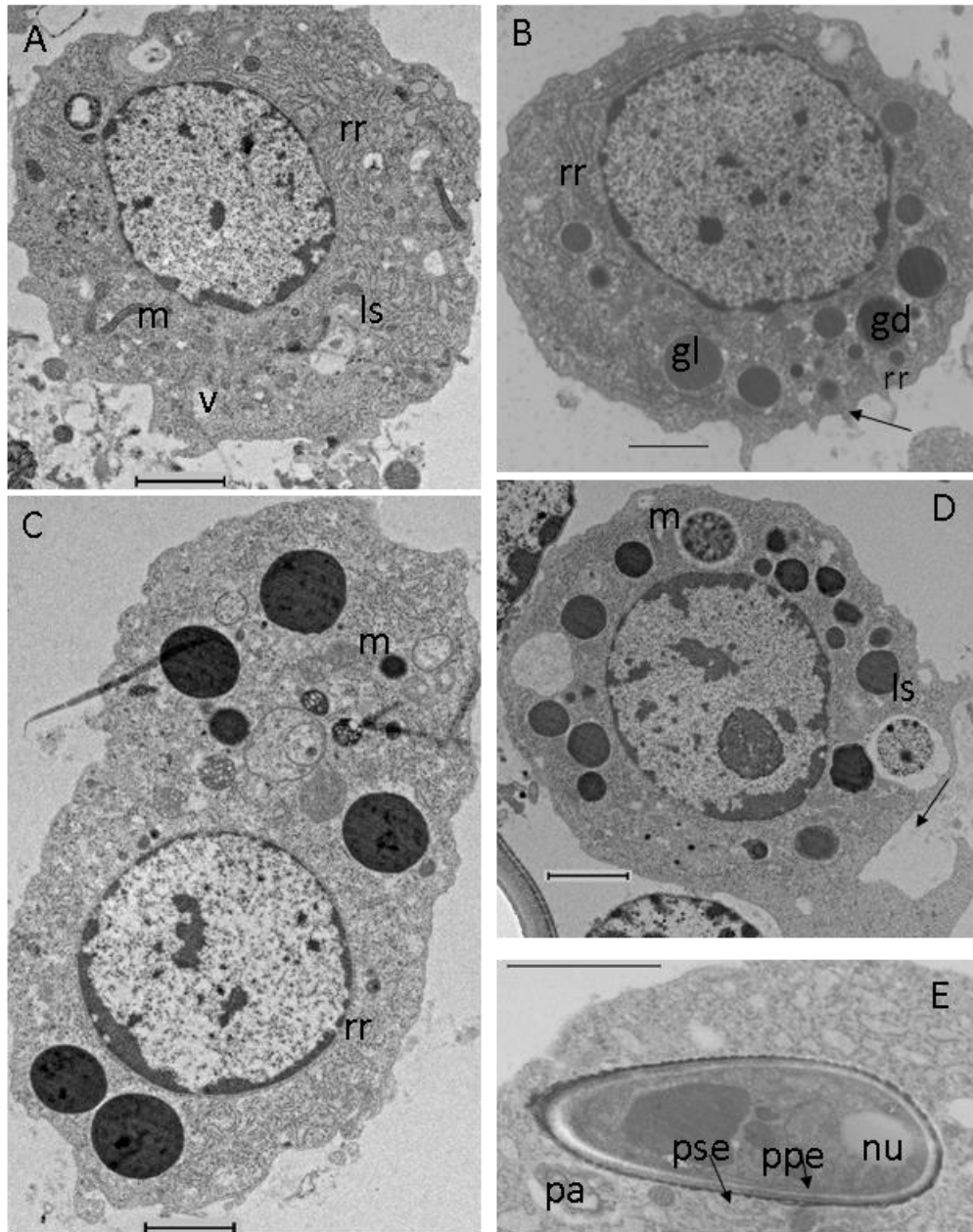


Figura 16. Eletromicrografias de granulócitos e plasmatócito de *Rhipicephalus microplus* após a infecção e estruturas fúngicas de *Metarhizium* spp. (A)Plasmatócito apresentando núcleo (nu), retículo endoplasmático (rr), mitocôndrias (m) e lisossomos secundários (ls) barra = 2 μ m; (B)Granulócito apresentando núcleo (nu), grânulos eletrodensos (gd) e eletroluscentes (gl), mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático(rr), barra = 2 μ m; (C) Plasmatócito apresentando núcleo (nu), mitocôndrias(m), retículo endoplasmático (rr), barra= 2 μ m; (D) Plasmatócito apresentando pseudópodes (seta preta), mitocôndrias(m) e lisossomos secundários (ls), barra = 2 μ m; (E)estrutura fúngica apresentando uma parede primária do esporo (ppe) e uma parede secundária do esporo (pse), núcleo (nu), mitocôndria (m), processo não identificado (pa) barra = 1 μ m.

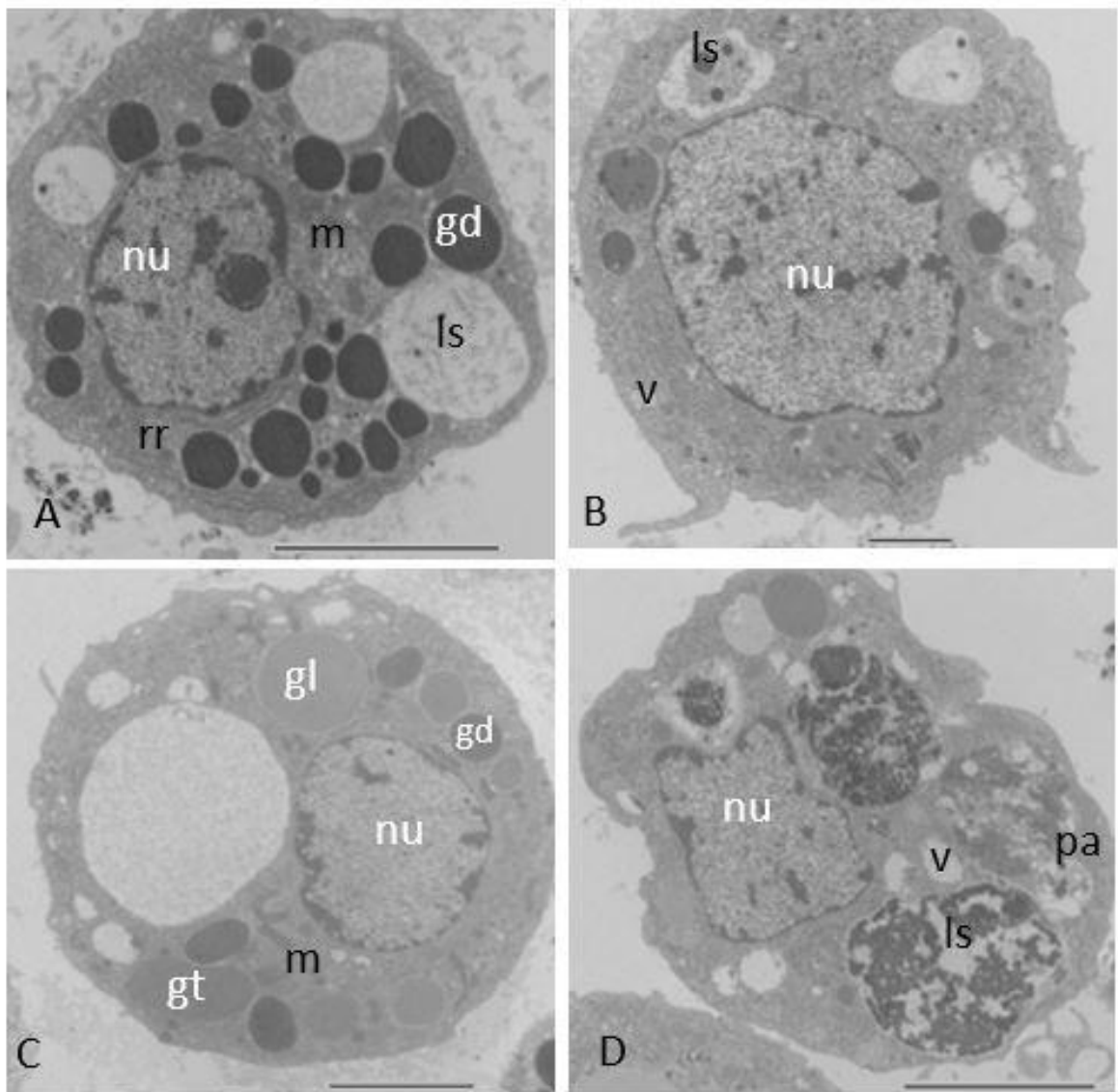


Figura 17. Eletromicrografias de granulócitos e plasmatócitos de *Rhipicephalus microplus* após a infecção por *Metarhizium* spp. (A) Granulócito apresentando núcleo (nu), algumas mitocôndrias (m), grânulos eletrodensos(gd) e núcleo (nu), barra = 5 μ m; (B) Plasmatócito apresentando núcleo (nu), lisossomos secundários (ls), vacúolos (v), barra representando 2 μ m; (C) Granulócito apresentando núcleo (nu), mitocôndrias (m), grânulos eletrodensos (gd) e eletroluscentes(gl) e grânulos de aspecto tubular (gt), barra = 5 μ m; (D) Plasmatócito apresentando núcleo (nu), lisossomos secundários (ls), vacúolos (v), processo não identificado (pa). Barra = 5 μ m.

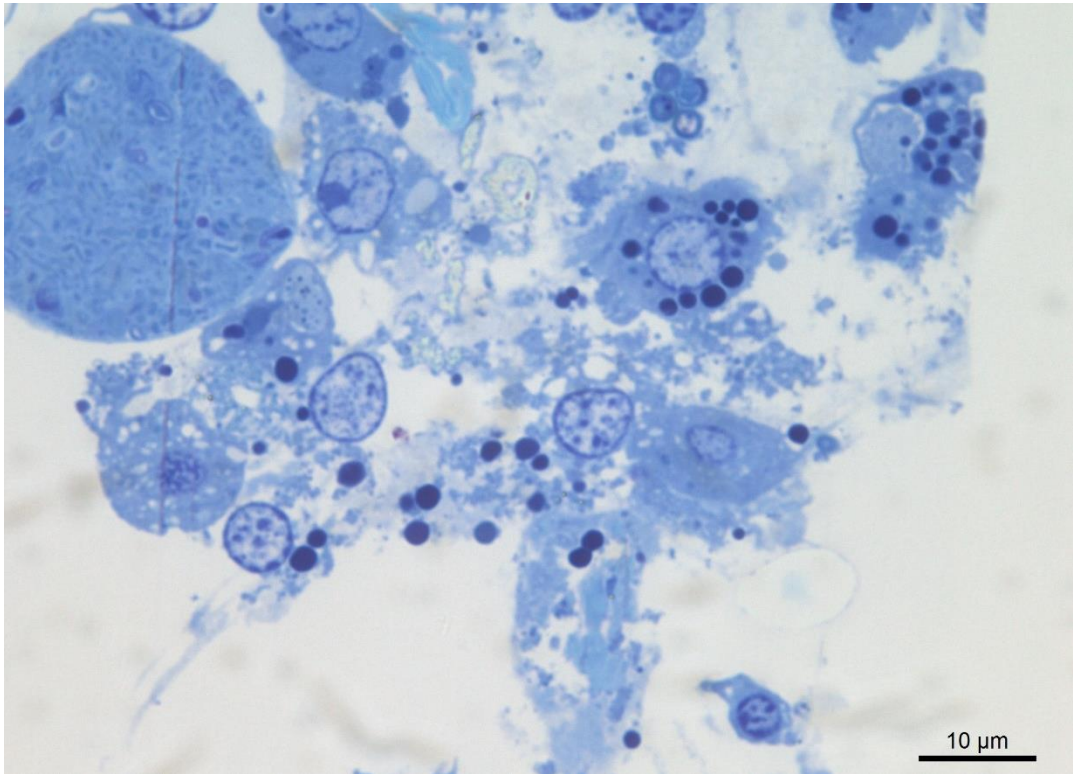


Figura 18. Corte semi-fino de microscopia eletrônica de transmissão de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* tratados com *Metarhizium* spp. e corados com azul de Toluidina. Barra = 10 μm.

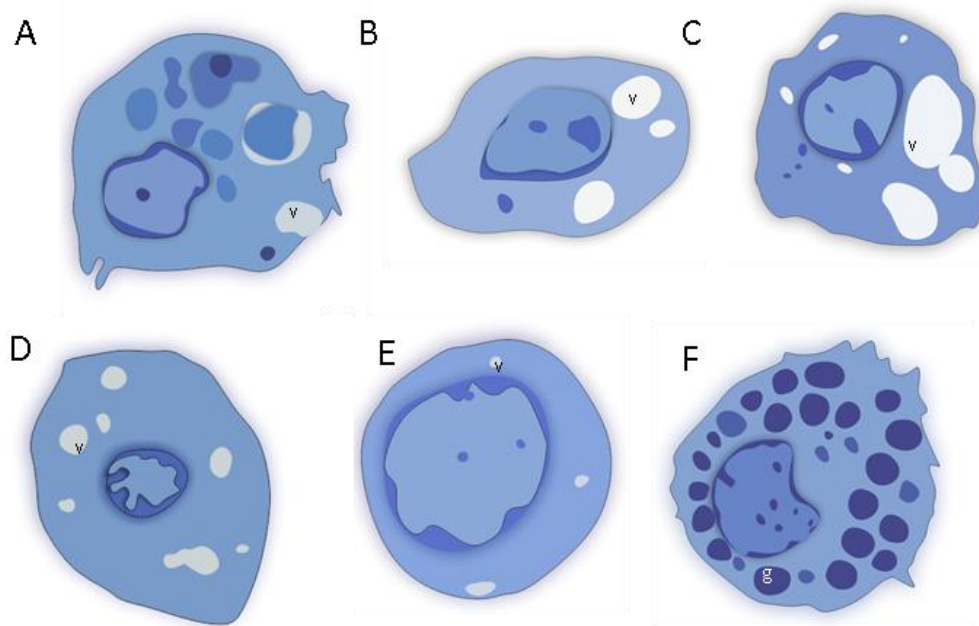


Figura 19. Representação esquemática de cortes semi-finos de microscopia eletrônica de transmissão de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* tratados com *Metarhizium spp.* (A, B, C, D e E) Plasmatócitos apresentando vacuolização no citoplasma (v), (F) granulócito apresentando grânulos(g).

5 DISCUSSÃO

Atualmente, o uso de fungos artropodopatogênicos exibe grande vantagem no controle biológico de carrapatos devido ao fato destes serem capazes de penetrar sobre a cutícula do parasita através de enzimas como proteases, quitinases e lipases, favorecendo assim a degradação da mesma (MADELIN 1967; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Desta forma, o controle microbiano apresenta maior especificidade e seletividade em comparação com o controle químico, efeitos secundários, permite a comercialização de alimentos sem a presença de resíduos químicos e ainda permite a associação com diversas formas de controle até mesmo com produtos químicos mais seletivos (ALVES, 1998).

Durante o processo infeccioso, o artrópode pode se defender através da imunidade humoral e a imunidade celular, sendo esta última desenvolvida pelos hemócitos (STERBA et al., 2011). Hemócitos são células especializadas que circulam na hemolinfa e desempenham um papel essencial no sistema imunológico de invertebrados, incluindo carrapatos. A coleta e o processamento das células do carrapato bovino ainda não possuem métodos padronizados, como as técnicas atualmente descritas na literatura para outras espécies de carrapato e insetos (GILLESPIE et al., 1997; HABEEB; ABOU EL-HAG, 2008; FEITOSA et al., 2015) nem sempre preservam a integridade das células. Os protocolos utilizados com frequência para o processamento de hemolinfa *R. microplus* são a) 5040 × g durante 10 minutos a 4 ° C ou b) 300 × g durante 10 minutos a 4 ° C (FOGAÇA et al., 2004; SILVA et al., 2006; FREITAS et al., 2015). No presente estudo, quando alguns protocolos foram aplicados às amostras de hemolinfa *R. microplus*, o sedimento formado no microtubo foi muito compacto, mostrando um volume celular reduzido, além da presença de grânulos que indicam a ruptura de células granuladas. De acordo com nossos resultados, quanto mais lenta a força centrífuga, menor é a ruptura celular.

Estudos anteriores sobre a força centrífuga e o tempo de centrifugação são relatados apenas em células de mamíferos. Estudos na relação entre a velocidade da centrífuga e a viabilidade celular das suspensões de células do fígado em ratos são descritos por Klaunig et al., (1981). Algumas pesquisas sobre glóbulos vermelhos demonstraram que menores força de centrifugação preservam a integridade das plaquetas, enquanto as forças altas ativam as plaquetas prematuramente (MARX, 2001; GONSHOR, 2002; DUGRILLON et al., 2002). Um estudo, porém, relatou maiores concentrações de células em maiores forças g (MAIA et al., 2009), opondo-se aos resultados obtidos com hemócitos no presente estudo. Ferraz et al., (2007)

testaram diferentes valores de RCF usando sangue de cães e relataram que altos valores de RCF danificaram plaquetas, o que foi demonstrado nos resultados com hemócitos no presente estudo. Quanto maior o RCF, mais significativa é a deposição de leucócitos no fundo do tubo, formando um sedimento que não se dissolve prontamente, reduzindo o número de leucócitos colhidos. Nos protocolos com menor força centrífuga, a recuperação de leucócitos foi maior, como observado no presente estudo com hemócitos de *R. microplus*.

No presente estudo, as amostras centrifugadas de acordo com o protocolo 1 ou sedimentadas durante 24h tiveram resultados estatisticamente similares quando o estudo avaliou o número de células recuperadas (Figura 4). Apesar disso, o tempo de armazenamento influenciou diretamente a viabilidade e a contaminação das células. Um estudo usando glóbulos vermelhos relatou que alterações metabólicas e físicas após o armazenamento das amostras, como redução do pH, concentrações reduzidas de adenosina 50-trifosfato (ATP) e 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e acumulação de potássio extracelular podem ocorrer. Mudanças físicas, incluindo perda de membrana e alterações associadas à forma das células também foram relatadas. Durante o período de armazenamento, as perdas de carboidratos, lipídios e proteínas da membrana podem ocorrer por uma variedade de mecanismos, além de lesões oxidativas de proteínas, diminuindo a integridade do citoesqueleto e criando neo-antígenos (PUTTER; SEGATCHIAN, 2017). Fazio et al. (2012) demonstraram que o tempo de armazenamento afetou linfócitos, monócitos e neutrófilos em amostras tratadas com EDTA, heparina ou citrato de sódio. Outro estudo também observou as mesmas mudanças (FAGGIO et al., 2013). As análises em amostras de sangue humano e equino relataram um aumento no volume de células armazenadas durante várias horas em temperatura de refrigeração (GULATI et al., 2002; CLARKE et al., 2002). Nos hemócitos, há poucos estudos que investigam a viabilidade das células após o armazenamento; Cheng e Chen (2000) sugeriram que o pH diminuído ou aumentado conduz à redução da concentração de hemócitos e leva à produção de fenoxidase. No presente estudo, os níveis de fenoxidase não foram medidos, apesar disso, sugerimos que quanto maior o tempo de armazenamento das amostras, mais facilmente elas podem ser contaminadas, o que é um problema sério para a cultura celular.

Alguns fungos entomopatogênicos são conhecidos por ter alta virulência contra carrapatos, bem como contra diferentes espécies de insetos (ROBERTS; ST LEGER, 2004; WANG; ST LEGER, 2006; LEEMON et al., 2008; SAMISH et al., 2014; PERINOTTO et al., 2017). No presente estudo, as duas espécies de *Metarhizium* não eram altamente virulentas contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* após imersão em suspensão fúngica. Vários fatores

estão envolvidos na virulência de um isolado fúngico em artrópodes, especialmente carrapatos que são muito mais tolerantes em comparação com insetos (CARRILLO et al., 2015; ERLER et al., 2015; MOHAMMADYANI et al., 2016; ROT et al., 2013; ALVES et al., 2017; FISCHHOFF et al., 2017). Alguns fatores são muito importantes para o aumento da virulência como a suscetibilidade das populações de alguns hospedeiros, suas espécies e estágio de vida (ou seja, algumas espécies e estágios de vida são mais suscetíveis do que outros), e também a quantidade de propágulos fúngicos necessários para matar o artrópode (ALDEN et al., 2001; MENT et al., 2012). Desta forma, sugere-se que a baixa virulência dos isolados ARSEF 2575 e ARSEF 549 para carrapatos, além da alta tolerância desenvolvida por carrapatos adultos quando expostos a fungos entomopatogênicos (OJEDA-CHI et al., 2010; CAMARGO et al., 2012), explica a baixa porcentagem de controle dos carrapatos observada no presente estudo. Além disso, as cepas de fungos mutantes foram usadas para demonstrar que a mutação de GFP não influenciava a virulência de fungos contra carrapatos e funcionava bem para a transformação de diversas espécies de *Metarhizium*, tendo Ment et al., (2012) demonstrando que há uma tendência de diminuição da virulência em cepas modificadas (MOON et al., 2008; MENT et al., 2012).

O número de hemócitos circulantes em insetos varia de acordo com a espécie e dentro de um único espécime em diferentes fases fisiológicas. O sexo, idade e estágio de desenvolvimento do artrópode podem influenciar no número de células na hemolinfa (NATION et al., 2016). Além disso, alguns hemócitos são encontrados aderidos em alguns órgãos e são lançados em circulação somente após circunstâncias oportunas, como ativação do sistema imunológico ou muda (NAPPPII, 1974; STOEPLER et al., 2013; NATION, 2016). O número de hemócitos que circulam em mosquitos adultos pode diminuir com a idade do inseto, pode aumentar após o repasto sanguíneo e pode aumentar ou diminuir quando esse artrópode é desafiado por agentes patogênicos (HILLYER et al., 2005; CASTILLO et al., 2006; BRAYNER et al., 2007; CASTILLO et al., 2011; BRYANT; MICHAEL, 2014). Estudos com *Anopheles gambiae* adultos mostraram que eles têm mais hemócitos circulantes do que *Aedes aegypti* em condições fisiológicas normais (CASTILLO et al., 2006; COGGINS et al., 2012). Nos carrapatos, a quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa pode variar durante uma infecção por fungos; esses estudos relataram uma redução no número de hemócitos circulantes quando as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram infectadas com *Beauveria bassiana*, explicando o papel imunossupressor dos fungos entomopatogênicos (SILVA et al., 2006; FREITAS et al., 2015), assim como os resultados do presente estudo.

No carrapato bovino, os estudos envolvendo morfologia celular e ultraestrutura são escassos e por esse motivo, a identificação através de microscopia ótica e de transmissão foi baseada em outras espécies de carrapatos e outros artrópodes (CARNEIRO; DAEMON, 1997; BOROVIKOVÁ; HYPISA, 2005, HABEEB; EL-HAG, 2008; FEITOSA, et al., 2015). Em *R. microplus*, estudos mais recentes foram desenvolvidos por Silva et al, (2006) que relataram os tipos celulares encontrados através de microscopia ótica, apresentando-se como pró-hemócitos, granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides, sendo os últimos dois tipos celulares encontrados em menor abundância. No entanto, no presente estudo, em microscopia ótica convencional, apenas cinco tipos celulares foram encontrados: pró-hemócitos, granulócitos com diferentes morfologias, plasmatócitos, esferulócitos e oenocitóides, diferindo também dos estudos envolvendo a espécie *Rhipicephalus sanguineus* que também apresentaram adipohemócitos (FEITOSA et al., 2015).

A microscopia eletrônica é muito importante para a classificação dos hemócitos. No entanto, não existe ainda na literatura a descrição ultraestrutural das células da hemolinfa de *R. microplus*. Desta forma, as descrições morfológicas foram comparadas com os achados em outras espécies de carrapato (BOROVICKOVÁ; HYPISA, 2005, HABEEB; EL-HAG, 2008; FEITOSA, et al., 2015).

No presente estudo, os pró-hemócitos se apresentavam como células de morfologia semelhante às descritas anteriormente por Habeeb e El-Hag (2008) e Feitosa et al. (2015) em outras espécies de carrapatos. Na ultraestrutura, elas contêm ribossomos e mitocôndrias, mas pouco retículo endoplasmático e Golgi. As características semelhantes desse tipo de hemócito em diferentes literaturas podem estar relacionadas com a função da mesma, sendo responsável possivelmente pela precursão de outros tipos de hemócitos (LAVINE; STRAND, 2002, KAVANAGH; REEVES, 2004). No entanto, ainda é incerta a origem dos outros tipos celulares (NATION, 2016).

Em relação aos plasmatócitos, essas células eram bem abundantes, polimórficas, núcleo central ou excêntrico, possuíam vesículas de diferentes tamanhos, vacúolos pequenos e mitocôndrias (SONENSHINE; ROE, 2014). Esse tipo celular era identificado como célula agranular anteriormente (KUHN; HAUG, 1994), no entanto, no presente estudo essas células se apresentavam com projeções citoplasmáticas e pseudópodes e com citoplasma agranular e levemente granular, diferente dos achados de Feitosa et al. (2015) que demonstraram que os plasmatócitos possuíam apenas pequenas granulações. Desta forma, sugere-se que este tipo celular esteja fortemente envolvido na resposta imune, sendo responsável pela remoção de

células apoptóticas, mas principalmente pelos processos de fagocitose e encapsulamento de patógenos, sendo semelhante aos monócitos de vertebrados (TOJO et al., 1999; HI et al., 2015).

Os granulócitos de insetos são células geralmente elípticas e ultraestruturalmente apresentam atividade de protease e seus compartimentos lisossomais possuem fosfatase ácida (NATION 2016). Para outras espécies de carrapato como *O. moubata* e *I. ricinus*, os granulócitos foram discriminados em dois tipos, baseando se na eletrondensidade dos seus grânulos e sua maturação (BOROVICKOVÁ; HYPISA, 2005; SONENSHINE; ROE, 2014). Já os autores que investigaram hemócitos de *R. sanguineus* afirmaram que as diferenças são somente devido à maturação celular (FEITOSA et al., 2015). No presente estudo, as células além de apresentarem grânulos de diferentes eletrondensidades e tamanhos, também apresentaram disposição variada em relação ao núcleo, algumas células apresentaram núcleo central e outras periférico. No entanto, não discriminamos como células diferentes, já que é necessário investigar a composição dos grânulos antes de escalonar essas células em outra classificação.

Os esferulócitos são células menos abundantes, mas em *R. sanguineus* aparentemente elas apresentam maior abundância (CARNEIRO; DAEMON, 1997 ; FEITOSA et al., 2015). São células com esférulas recobrando quase totalmente o citoplasma e presença de poucas organelas, corroborando com os achados neste estudo, assim como outros estudos em insetos (BRAYNER et al., 2005) e em carrapatos (SONENSHINE; HYNES, 2008). Em insetos, este tipo celular pode estar envolvido com a renovação tecidual, transporte de diversas substâncias como hormônios e até mesmo a produção de algumas proteínas da hemolinfa (NEGREIRO et al., 2004).

Adipohemócitos são células encontradas em insetos e algumas espécies de carrapato e apresentam numerosas gotículas lipídicas de tamanho e forma variadas, que ocupam quase que totalmente o citoplasma, algumas mitocôndrias e núcleo excêntrico (CUNHA et al., 2009). Em *Aedes aegypti*, este tipo celular é considerado o segundo mais abundante e ainda podem conter alguns grânulos (HILLYER; CHRISTENSEN, 2002). Em carrapatos, não têm muitos estudos envolvendo este tipo celular e em *R. sanguineus* este tipo celular foi raramente encontrado na hemolinfa (FEITOSA et al., 2015). No presente estudo, não foi encontrado este tipo celular corroborando com outros estudos envolvendo outros carrapatos (BOROVICKOVÁ; HYPISA, 2005; HABEEB; EL-HAG, 2008). Desta forma, o fato desta célula não ser encontrada na hemolinfa de *R. microplus* possivelmente se deve ao fato da sua baixa abundância ou até mesmo devido ao fato de que essas células são microscopicamente

idênticas às células do corpo gorduroso, o que poderia levar à classificação errônea desses hemócitos, podendo ser também plasmatócitos repletos de gotículas lipídicas (GUPTA, 1985; HILLYER; CHRISTENSEN, 2002; NATION, 2016).

Os oenocitóides são células de formato e tamanho variados, não apresentam pseudópodes e o núcleo é geralmente excêntrico (GUPTA, 1985). São células não fagocíticas, mas que podem estar envolvidas com o processo de encapsulamento (EGGENBERGER et al., 1990). Em microscopia de luz, essas células apresentam citoplasma homogêneo ou com pequenas granulações refráteis (CARNEIRO; DAEMON, 1997). Em microscopia eletrônica, este tipo celular se apresenta como pobre em organelas, mas pode apresentar algumas mitocôndrias e vesículas eletróluscentes (GIULIANINI et al., 2003). Em carrapatos, este tipo de célula é pouco abundante, assim, neste trabalho foram encontradas poucas células e apenas na microscopia de luz. Desta forma, sugere-se que a baixa abundância dessas células no presente estudo se deve ao fato delas se romperem facilmente e esse rompimento está associado com a mobilização de cálcio, ativando principalmente a proteína quinase C e abrindo os canais de cálcio, gerando assim uma pressão osmótica intracelular e ocasionando o rompimento das células (SHRESTHA et al., 2015).

O presente estudo demonstrou que o entomopatógeno *Metarhizium* spp. além de causar a morte do artrópode por compressão mecânica ou pela liberação de toxinas, também pode ocasionar letalidade para as células do carrapato *R. microplus*, possivelmente ocasionando morte celular. Mas para melhor mimetização do processo infeccioso, blastosporos poderiam ser empregados na avaliação de morte celular. Após a infecção fúngica, não foram visualizados pró-hemócitos e as populações de hemócitos mais observadas foram os granulócitos e plasmatócitos.

Os granulócitos dos carrapatos expostos ao fungo se apresentavam aparentemente com menor quantidade de grânulos, os grânulos apresentavam eletrondensidades diferentes e até mesmo formato diferenciados, presença de vacúolos e lisossomos. Estas células são guiadas para iniciar, mediar e terminar o processo de encapsulamento, formando uma monocamada sobre o agente estranho (SONENSHINE; HYNES, 2008). No entanto, no presente estudo não foi visualizado processos de encapsulamento do fungo *Metarhizium* spp, devendo-se ao fato dos tempos de tratamento utilizados serem muito longos.

Os plasmatócitos se apresentavam com vacuolização e presença de lisossomos secundários repletos de material de eletrondensidades diferentes. Nos experimentos realizados neste trabalho, o fungo foi internalizado nas células e aparentemente as células mesmo com a

presença de vacúolos e lisossomos, apresentavam mitocôndrias em funcionamento normal, demonstrando que as células estavam viáveis, mesmo quando o fungo estava em processo de germinação. No entanto, mais estudos são necessários para investigar o completo processo de fagocitose ou internalização fúngica e os decorrentes processos autofágicos dos hemócitos.

A não visualização de outros tipos celulares como pró-hemócitos, esferulócitos e oenocitóides na hemolinfa após a infecção fúngica se deve possivelmente pela redução da concentração dessas células, possivelmente ocorrendo porque essas células não possuem função específica na defesa celular e por essa razão são mais vulneráveis à ação dos patógenos (LAVINE; STRAND, 2002; CUNHA et al., 2009). Pró-hemócitos também podem estar em menor concentração na hemolinfa de artrópodes expostos a patógenos porque estas células podem ter se diferenciado em granulócitos e plasmatócitos (FEITOSA, 2015). Ainda, as destruxinas, metabólitos secundários, produzidas por *Metarhizium* podem promover a apoptose dos hemócitos, diminuindo assim o número de hemócitos circulantes na hemolinfa e conseqüentemente reduzindo também a concentração de proteínas hemocitárias (WIEGAND et al., 2000).

Os hemócitos possuem diversas funções, principalmente aquelas voltadas para a proteção dos artrópodes contra patógenos, produção e secreção de peroxidases, encapsulamento e fagocitose (NATION, 2016). As interações entre fungos e hemócitos de carrapato não são bem elucidadas, desta forma, é muito importante a caracterização morfológica dessas células e as alterações ocasionadas em processos infecciosos para que se investigue a tolerância que alguns artrópodes podem desenvolver aos agentes entomopatogênicos através da resposta imune celular.

A nodução em insetos é caracterizada pela agregação de um grande número de hemócitos ao redor do patógeno e pode ou não sofrer o processo de melanização. A formação dos nódulos pode ser mediada por lectinas, mas o processo ainda não foi bem caracterizado (NATION, 2016).

O encapsulamento de patógenos ou corpos estranhos é um dos processos mais comuns de defesa em artrópodes e visam o englobamento de alvos maiores como nematóides. Em insetos, os granulócitos são responsáveis por este processo, no qual várias camadas das células envolvem o patógeno, formando uma cápsula e conseguindo inativá-lo pela produção de radicais livres (NAPPI; OTTAVIANI, 2000). Em carrapatos, este processo pode ainda envolver os plasmatócitos (KOPÁCEK et al., 2010).

O parasitismo por fungos em células de artrópodes tem sido relatado apenas envolvendo o fungo *Microsporidium*, que são eucariotos, parasitas obrigatórios de diversas espécies animais e que foi considerado um fungo entomopatogênico (POLAR et al., 2008). Além disso, um grande número de patógenos são capazes de sobreviver nas células hospedeiras, como por exemplo o que acontece com o fungo *Histoplasma capsulatum* que pode ser fagocitado por macrófagos alveolares e ainda são capazes de se multiplicar no interior da célula (NEWMAN et al., 2006). Supostamente, a colonização intracelular do fungo pode favorecer este patógeno, permitindo algum tipo de latência e assim desestabilizar a saúde do hospedeiro. Ainda, alguns fatores como a falta de nutrientes e estresse podem ocasionar um rápido crescimento fúngico, levando à dessecação e morte do artrópode (KURTII et al., 2008).

Estudos envolvendo o uso de fungos entomopatogênicos para o controle do carrapato, tem utilizado grandes concentrações fúngicas administradas sobre a cutícula do artrópode ou diretamente inoculado na hemocele (SILVA et al., 2006; FREITAS et al., 2015). Contudo, essas condições não refletem o que naturalmente ocorre no meio ambiente, já que as concentrações fúngicas nunca são altas (QUESADA-MORAGA et al., 2007). Além disso, o uso de blastosporos poderia estimular o processo de fagocitose e contribuir na elucidação da resposta imune celular em *R. microplus*, já que o conídio tem o poder de penetração pela cutícula do artrópode e depois tem sua diferenciação celular, aproximando os resultados de fagocitose aqui encontrados com a realidade.

Quando expostos à patógenos como vírus, bactérias, protozoários e outros microrganismos, os hemócitos conseguem responder à infecção (NATION, 2016). A população de células aumenta consideravelmente na hemolinfa até que os patógenos sejam eliminados. Contudo, quanto mais patogênico é o microrganismo, mais facilmente este levará à morte celular através de processos autofágicos. Além disso, a via autofágica parece ter um papel importante durante a interação patógeno-célula hospedeira, favorecendo ou dificultando a infecção. Esta autofagia, consiste no mecanismo de degradação de quaisquer componentes citoplasmáticos através da via lisossomal, de modo seletivo ou não seletivo. Este processo ocorre fisiologicamente durante todo o ciclo celular, mas é exacerbado em condições de estresse como na deprivação nutricional. Além disso, a autofagia promove em determinados tipos celulares a modulação do ciclo celular, crescimento, apresentação antigênica, produção de citocinas e degradação de patógenos intracelulares (MÜNZN, 2009). O desequilíbrio dessa via autofágica (aumento ou redução) pode provocar morte celular autofágica (KROEMER;

LEVINE, 2008). Assim foi demonstrado no presente estudo, onde processos autofágicos apareceram nos grupos desafiados por *Metarhizium*.

Desta forma, o estudo aqui desenvolvido demonstra a primeira avaliação de hemócitos de *R. microplus* em microscopia eletrônica de transmissão e tenta elucidar a resposta imune celular do carrapato bovino para que se possa chegar a uma classificação dos hemócitos de uma maneira mais correta e assim, poder investigar o papel dessas células na resposta aos fungos entomopatogênicos.

6 CONCLUSÕES

Após todas as avaliações do presente estudo, foi possível concluir que:

- O melhor protocolo para a obtenção de hemócitos íntegros para *Rhipicephalus microplus* é a de $500 \times g$ durante três minutos.
- Os isolados de *Metarhizium* spp., mesmo quando marcados com GFP não apresentaram diferença em sua virulência em comparação com as cepas selvagens em ensaio biológico com fêmeas de *R. microplus*.
- Os hemócitos de *R. microplus* em condições fisiológicas normais podem ser classificados em pró-hemócitos, granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos e oenocitóides.
- Após a infecção fúngica foi possível identificar que os hemócitos de *R. microplus* são capazes de fagocitar *Metarhizium* spp. e podem apresentar alterações em sua morfologia.
- Os hemócitos de *R. microplus* podem sofrer processos sugestivos de autofagia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDEN, L., DEMOLING, F., BAATH, E. Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1830–1838, 2001.
- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.
- ALVES, F.M., BERNARDO, C.C., PAIXÃO, F.R.S., BARRETO, L.P., LUZ, C., HUMBER, R.A., FERNANDES, E.K.K. Heat-stressed *Metarhizium anisopliae*: viability (in vitro) and virulence (in vivo) assessments against the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology Research**, v.116, p.111-121, 2017.
- 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.
- BAE, Y. S., CHOI, M. K., LEE, W. J. Dual oxidase in mucosal immunity and host-microbe homeostasis. **Trends Immunology**, v.31, p. 278–287, 2010.
- BALASHOV, Y.S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) Vectors of diseases in man and animals. **Miscell Public Entomological Society of America**, v.8, p.161–376, 1972.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan, 2006, 223p.
- BEHIE, S. W., ZELISKO, P. M. & BIDOCHKA, M. J. Endophytic insect–parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, v.336, p.1576–1577, 2012.
- BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE) I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, 1974.
- BIDOCHKA, M.J., ST LEGER, R.J. AND ROBERTS, D.W. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. In: Goettel, M.S. and Johnson, D.L. (eds) Microbial Control of Grasshoppers and Locusts. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.213–224, 1997.
- 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**, v.29, p.351–354, 1999.
- BOROVICKOVÁ, B., HYPISA, V. Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. **Experimental Applied Acarology**, v.35, p. 317-333, 2005.
- BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**, v.254, p.197-215, 2003.
- BOULANGER, N., BRUN, R., EHRET-SABATIER, L., KUNZ, C., BULET, P. Immunopeptides in the defense reactions of *Glossina morsitans* to bacterial and *Trypanosoma brucei brucei* infections. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p. 369-375, 2002.
- BRAYNER, F.A., ARAUJO, H.R., CAVALCANTI, M.G., ALVES, L.C., PEIXOTO, C.A.

Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Micron**, v.36, p. 359-367, 2005.

BRAYNER, F.A., ARAUJO, H.R., SANTOS, S.S., CAVALCANTI, M.G., ALVES, L.C., SOUZA, J.R., PEIXOTO, C.A. Haemocyte population and ultrastructural changes during the immune response of the mosquito *Culex quinquefasciatus* to microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.21, p. 112-120, 2007.

BRYANT, W.B., MICHEL, K. Blood feeding induces hemocyte proliferation and activation in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae* Giles. **Journal of Experimental Biology**, v.217, p. 1238-1245, 2014.

BRINTON, L. P., AND BURGDORFER, W. **Journal of Bacteriology**, v.105, p.1149-1159, 1971.

BROWNE, N., HEELAN, M., KAVANAGH, K., An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, p. 597-603, 2013.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J. L. HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 23, p. 329-344, 1999.

BURGDORFER, W. Hemolymph test: A technique for detection of rickettsiae in tick. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.19 (6), p.1010–1014, 1970.

CAMARGO, M. G., NOGUEIRA, M. R. S., MARCIANO, A. F., PERINOTTO, W. M. S., COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B., SCOTT, F. B. et al. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 38-42.

CAMARGO, M.G., GÔLO, P.S., ANGELO, I.C., PERINOTTO, W.M.S., SA, F.A., QUINELATO, S., BITTENCOURT, V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v.188, p. 140–147, 2012.

CASTILLO, J.C., ROBERTSON, A.E., STRAND, M.R. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.36, p.891-903, 2006.

CASTILLO, J., BROWN, M.R., STRAND, M.R. Blood feeding and insulin-like peptide 3 stimulate proliferation of hemocytes in the mosquito *Aedes aegypti*. **PLoS Pathogens**, v.7, p. e1002274, 2011.

CARNEIRO, M.E., DAEMON, E. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (IXODOIDEA: Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6(1), p.1-9, 1997.

CARRILLO, D., DUNLAP, C.A., AVERY, P.B., NAVARRETE, J., DUNCAN, R.E., PENA, J.E. Entomopathogenic fungi as biological control agents for the vector of the laurel wilt disease, the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, v.81, p. 44–50, 2015.

- CHENG, W., CHEN, J.C. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish Shellfish Immunology**, v.10, p.387-391, 2000.
- CLARKE, P., MOGG, T.V., TVEDTEN, H.W., KORCAL, D. Artfactual changes in equine blood following storage, detected using the Advia 120 hematology analyzer. **Veterinary Clinical Pathology**, v.31, p. 90-94, 2002.
- COGGINS, S.A., ESTEVEZ-LAO, T.Y., HILLYER, J.F. Increased survivorship following bacterial infection by the mosquito *Aedes aegypti* as compared to *Anopheles gambiae* correlates with increased transcriptional induction of antimicrobial peptides. **Developmental & Comparative Immunology**, v.37, p.390-401, 2012.
- CUNHA, F.M., WANDERLEY-TEIXEIRA, V., TEIXEIRA, A.A.C., ALBUQUERQUE, A.C., ALVES, L.C., LIMA, L.A. Caracterização dos hemócitos de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) e avaliação hemocitária após parasitismo por *Metarhizium anisopliae*. **Neotropical Entomology**, v.38 (2), p. 293-297, 2009.
- CUNHA, F.M., CAETANO, F.H., WANDERLEY-TEIXEIRA, V., TORRES, J.B., TEIXEIRA, A.A.C., ALVES, L.C. Ultra-structure and histochemistry of digestive cells of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with prey reared on Bt-cotton. *Micron*, v.43, p. 245–250, 2012.
- DEKEN, X. D., CORVILAIN, B., DUMONT, J. E., MIOT, F. Roles of DUOX-mediated hydrogen peroxide in metabolism, host defense, and signaling. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, p. 2776–2793, 2013.
- DIAS, F. A., GANDARA, A. C., QUEIROZ-BARROS, F. G., OLIVEIRA, R. L., SORGINE, M. H., BRAZ, G. R., et al. Ovarian dual oxidase (Duox) activity is essential for insect eggshell hardening and waterproofing. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, p. 35058–35067, 2013.
- DOMINGUEZ-GARCIA, D.I., ROSARIO-CRUZ, R., ALMAZAN-GARCIA, C., OAXACA, J.A.S., DE LA FUENTE, J. *Boophilus micoplus*: Biological and molecular aspects of acaricide resistance and their impact on animal health. **Tropical and subtropical Agroecosystems**, v.12, p.181-192, 2010.
- DRIVER JD, HOLBEN WE, RILLIG MC. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p. 101–106, 2005.
- DRUMMOND, R. O.; GLADNEY, W. J.; WHETSTONE, T. M.; ERNST, S. E. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. **Journal Economic Entomology**, v. 64, p. 686-688, 1971.
- DUGRILLON, A., EICHLER, H., KERN, S., KLÜTER, H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.31, p.615–9, 2002.
- EGGENBERGER, L.R., LAMOREAUX, W.J., COONS, L.B. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental Applied Acarology**, v.9,p.279–287, 1990.

- ERLER, F., ATES, A.O. Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Coleoptera: Scarabaeidae), as biological control agents against the June beetle. **Journal of Insect Science**, v.15, p.44, 2015.
- FAGGIO, C., ARFUSO, F., PICCIONE, G., ZUMBO, A., FAZIO, F. Effect of Three different anticoagulants and storage time on haematological parameters of *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.14, p.615-621, 2014.
- FANG, W., VEGA-RODRIGUEZ, J., GHOSH, A.K., JACOBS-LORENA, M., KANG, A., ST LEGER, R.J. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. **Science**, v.331, p. 1074-1077, 2011.
- 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.
- FARIA, M., MARTINS, I., SOUZA, D.A., MASCARIN, G.M., LOPES, R.B. Susceptibility of the biocontrol fungi *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma asperellum* (Ascomycota: Hypocreales) to imbibitional damage is driven by conidial vigor. **Biological Control**, v.107, p.87–94, 2017.
- FAZIO, F., SATHEESHKUMAR, P., SENTHIL KUMAR, D., FAGGIO, C., PICCIONE, G. (2012). A comparative study of haematological and blood chemistry of Indian and Italian Grey Mullet (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758). **Herbert Open Access Journal Biology**, v.5, p.1-5, 2012.
- FEARON, D.T. Seeking wisdom in innate immunity. **Nature**, v. 388, p.323-324, 1997.
- FEITOSA, A.P.S., ALVES, L.C., CHAVES, M.M., VERAS, D.L., SILVA, E.M., ALIANÇA, A.S.S., FRANÇA, I.R.S., GONÇALVES, G.G.A., LIMA-FILHO, J.L., BRAYNER, F.A. Hemocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae): Characterization, Population Abundance, and Ultrastructural Changes Following Challenge with *Leishmania infantum*. **Journal of Medical Entomology**, p.1-10, 2015.
- FERRAZ, V.C.M., FERRIGNO, C.R.A., SCHMAEDECKE, A. Platelet concentration of platelet-rich plasma from dog, obtained through three centrifugation speeds. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, p.435-440, 2007.
- FISCHHOFF, I.R., KEESING, F., OSTFELD, R.S. The tick biocontrol agent *Metarhizium brunneum* (= *M. anisopliae*) (strain F52) does not reduce non-target arthropods. **Plos one**, v.12, p.1-15, 2017.
- FOGACA, A. C. et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, p. 191–200, 2004.
- FOGAÇA, A. C.; ALMEIDA, I.; EBERLIN, M.; TANAKA, A.; BULET, P.; DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, v. 27(4), p. 667– 674, 2006.
- FREITAS, M.C., COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B., PERINOTTO, W.M.S., NOGUEIRA, M.R.S., CHAGAS, T.T., MARCIANO, A.F., CAMARGO, M.G., QUINELATO, S., GOLO, P.S., SÁ, F., BITTENCOURT, V.R.E.P. Quantificação de hemócitos de fêmeas ingurgitadas

de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Beauveria bassiana* sl. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.37, p.63-70, 2015.

GAO, Q., JIN, K., YING, S.H., ZHANG, Y., XIAO, G., SHANG, Y., DUAN, Z., HU, X., XIE, X.Q., ZHOU, G. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. **PLoS Genetics**, v. 7, p. e1001264, 2011.

GILLESPIE, J.P., KANOST, M.R., TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, v.42, p.611–643, 1997.

GIULIANINI, P.G., BERTOLO, F., BATTISTELLA, S., AMIRANTE, S.A. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis. **Tissue Cell**, v.35, p. 243-251, 2003.

GLARE T, CARADUS J, GELERNTER W, JACKSON T, KEYHANI N. Have biopesticides come of age? **Trends Biotechnology**, v.30, p.250–258, 2012.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. D.; LEON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potencial economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 150-156, 2014.

GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: Background and process. **The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v.22, p.547, 2002.

GUIMARÃES, J., MARQUES, E.J., WANDERLEY-TEIXEIRA, V., DE ALBUQUERQUE, A.C., DOS PASSOS, E.M., SILVA, C.C., et al. Sublethal effect of concentrations of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok on the larval stage and immunologic characteristics of *Diatraea flavipennella* (BOX) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v.86, p. 1973-1984, 2014.

GULATI, G.L., HYLAND, L.J., KOCHER, W., SCHWARTING, R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine Online**, v.126, p. 336–342, 2002.

GUPTA, A.P. Cellular elements in the hemolymph: Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, **Pergamon Press**, p. 402-444, 1985.

HABEEB, S.M., ABOU EL-HAG, H.A. Ultrastructural changes in hemocyte cells of hard tick (*Hyalomma dromedarii*: Ixodidae): a model of *Bacillus thuringiensis* var. thuringiensis H14;-endotoxin mode of action. **American-Eurasian Journal Of Agricultural & Environmental Sciences**, v.3, p. 829–836, 2008.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, S., LANZ, H., RODRIGUEZ, M.H., GONZÁLEZ-CERON, L., TSUTSUMI, V. Cellular-Mediated Reactions to Foreign Organisms Inoculated into the Hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v.39, p.61-69, 2002.

YI, Y., WU, G., L J. Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* immune response to hemocoel injection of entomopathogenic nematode cuticles. **Parasitology Research**, v.115, p.597–608, 2015.

- HILLYER, J.F., SCHMIDT, S.L., CHRISTENSEN, B.M. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. **Cell and Tissue Research**, v.313, p.117-127, 2003.
- HILLYER, J. F. et al. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. **Cellular Microbiology**, v. 7, p. 39–51, 2005.
- HILLYER, J.F., STRAND, M.R. Mosquito hemocyte-mediated immune responses. **Current Opinion in Insect Science**, v.3, p. 14-21, 2014.
- HOFFMANN, J. A. AND HETRU, C. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. **Immunology**, v.13(41), p. 1-415, 1992.
- HORN, S.C., ARTECHE, C.C.P. Situação da Pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**. V.4, p.12–32, 1985.
- HU, G., ST. LEGER, R.J. Field Studies Using a Recombinant Mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) Reveal that It Is Rhizosphere Competent. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6383-6387, 2002.
- HU, X., XIAO, G., ZHENG, P., SHANG, Y., SU, Y., ZHANG, X., LIU, X., ZHAN, S., ST LEGER, R.J., WANG, C. Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.111, p.16796–16801, 2014.
- HULTMARK, D., STEINER, H., RASMUSON, T., BOMAN, H.G. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. **European Journal of Biochemistry**, v.106, p. 7-16, 1980.
- IMLER, J. L. & HOFFMANN, J. A. Toll receptors in innate immunity. **Trends in Cell Biology**, v.11, p. 304–311, 2001.
- IMLER, J.L., BULET, P. Antimicrobial peptides in Drosophila: structures, activities and gene regulation. **Chemical Immunology and Allergy**, v 86, p.1–21, 2005.
- JABER, L.R., SALEM, N.M. Endophytic colonization of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) for managing *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV) in cucurbits. **Biocontrol Science Technology**, v.24, p.1096–1109, 2014.
- JIRAVANICHPAISAL, P., LEE, B.L., SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v.211, p. 213-236, 2006.
- 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, 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– 65, 2001.
- KAVANAGH, K., REEVES, E.P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, p.101–112, 2004.

- KIM, S.H., LEE, W.J. Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.3, p.116, 2014.
- KING, J.G, HILLYER, J.F. Spatial and temporal in vivo analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. **BMC Biology**, v.11, p.55, 2013.
- KLAUNIG, J.E., GOLDBLATT, P.J., HINTON, D.E., LIPSKY, M.N., CHACKO, J., TRUMP, B.F. Mouse liver cell culture. I. **Hepatocyte isolation In Vitro**, v.17, p. 913-925, 1981.
- KLEINO, A., AND N. SILVERMAN. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. **Developmental and Comparative Immunology**, v.42, p. 25–35, 2014.
- KOCAN, K. M., DE LA FUENTE J., MANZANO-ROMAN R., NARANJO V., HYNES W. L., SONENSHINE D. E. Silencing expression of the defensin, varisin, in male *Dermacentor variabilis* by RNA interference results in reduced *Anaplasma marginale* infections. **Experimental Applied Acarology**, v.46, p.17–28, 2008.
- KOPACEK, P.; HAJDUSEK, O.; BURESOVA, V.; DAFFRE, S. Tick innate immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 708, p. 137-162, 2010.
- KROEMER G, LEVINE B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9(12), p.1004-1010, 2008.
- KUHN, K.H., HAUG, T. Ultrastructural, cytochemical, and immunocytochemical characterization of haemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata). **Cell and Tissue Research**, v. 277, p. 493-504, 1994.
- KUMAR, S., MOLINA-CRUZ, A., GUPTA, L., RODRIGUES, J., BARILLAS-MURY, C. A peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in *Anopheles gambiae*. **Science**, v.327, p. 1644–1648, 2010.
- KURTTI, T.J., KEYHANI, N.O. Intracellular infection of tick cell lines by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v.154, p.1700–1709, 2008.
- LACEY L. A., GRZYWACZ D., SHAPIRO-ILAN D. I., FRUTOS R., BROWNBRIDGE M. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal Invertebrate Pathology**, v.132, p.1-41, 2015.
- LACKIE, A.M. Hemocyte behaviour. **Advances in Insect Physiology**, v.21, p.85–178, 1988.
- LAMPROU, I., TSAKAS, S., THEODOROU, G.L., KARAKANTZA, M., LAMPROPOULOU, M., MARMARAS, V.J. Uptake of LPS/E. coli/latex beads via distinct signalling pathways in medfly hemocytes: the role of MAP kinases activation and protein secretion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1744, p. 1-10, 2005.
- 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, p.314-327, 2007.
- LANZA L. M. MONTEIRO A. C. MALHEIROS E. B. Sensibility of *Metarhizium anisopliae* to temperature and moisture in three soil types. **Ciencia Rural**, v.39, p. 6 – 12, 2009.

- LAVINE, M.D., STRAND, M.R. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p. 965-974, 2001.
- LAVINE, M.D., STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.1295-1309, 2002.
- LAVINE, M.D., STRAND, M.R. Haemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple alpha and beta integrin subunits. **Insect Molecular Biology**, v.12, p.441-452, 2003.
- LEEMON, D.M, JONSSON, N.N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 40-49, 2008.
- LIU, H., WU, C., MATSUDA, Y., KAWABATA, S.I., LEE, B.L., SÖDERHÄLL, K., SÖDERHÄLL, I. Peptidoglycan activation of the proPO-system without a peptidoglycan receptor protein (PGRP)? **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, p. 51-61, 2011.
- LIMA, C.A., SASAKI, S.D., TANAKA, A.S., BMCYSTATIN. A cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.347, p.44–50, 2006.
- LUZ, C.; TIGANO, M. S.; SILVA, I. G.; CORDEIRO, C. M. T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolate to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p.839-846, 1998.
- LIGOXYGAKIS, P., PELTE, N., HOFFMANN, J. A. & REICHHART, J. M. Activation of Drosophila Toll during fungal infection by a blood serine protease. **Science**, v. 297, p. 114–116, 2002.
- LING, E., YU, X.Q. Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immunelectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Developmental and Comparative Immunology**, v.30(3), p.289-299, 2006.
- MADELIN, M. F, ROBINSON, R. E, AND WILLIAMS, R. S., 1967, Appressorium like structures in insect parasitizing deuteromycetes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.9, p. 404–412, 1967.
- MAIA, L., SOUZA, M.V., JÚNIOR, J.I.R., OLIVEIRA, A.C., ALVES, G.E.S., BENJAMIN, L.A. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.29, p. 618-626, 2009.
- MAMALI, I., LAMPROU, I., KARAGIANNIS, F., KARAKANTZA, M., LAMPROPOULOU, M., MARMARAS, V.J. A beta integrin subunit regulates bacterial phagocytosis in medfly haemocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, v.33, p 858-866, 2009.
- MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, v.10, p. 225–228, 2001.
- MARMARAS, V.J., LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. **Cellular Signalling**, v. 21, p.186-195, 2009.

- MARRONE, P.G. Barriers to adoption of biological control agents and biological pesticides. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v.2, p.1–12, 2007.
- MENT, D., CHURCHILL, A.C.L., GLAZER, I., REHNER, S.A., ROT, A., DONZELLI, B.G.G., SAMISH, M. Resistant ticks inhibit *Metarhizium* infection prior to haemocoel invasion by reducing fungal viability on the cuticle surface. **Environmental Microbiology**, v.14(6), p. 1570-1583, 2012.
- MILLER, J.S., HOWARD, R.W., RANA, R.L., TUNAZ, H., STANLEY, D.V. Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adult of the cricket, *Gryllus assimilis*. **Journal Insect Physiology**, v.45, p.75-83, 1999.
- MOHAMMADYANI, M., KARIMI, J., TAHERI, P., SADEGHI, H., ZARE, R. (2016). Entomopathogenic fungi as promising biocontrol agents for the rosaceous longhorn beetle, *Osphranteria coerulescens*. **Biological Control**, v.6, p. 579–590, 2016.
- MONTEIRO, C.M., PRATA, M.C., FURLONG, J., FAZA, A.P., MENDES, A.S., ANDALÓ, V., MOINO-JUNIOR, A. *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.106, p. 821-826, 2010.
- MOON, Y.S., DONZELLI, B.G.G., KRASNOFF, S., MCLANE, H., GRIGGS, M.H., COOKE, P., CHURCHILL, A.C.L. Agrobacterium mediated disruption of a non ribosomal peptide synthetase gene in the invertebrate pathogen *Metarhizium anisopliae* reveals a peptide spore factor. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.4366–4380, 2008.
- MORGAN, M.J, LIU, Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. **Cell Research**, v.21, p.103–115, 2011.
- MULENGA A., KHUMTHONG R., CHALAIRE K. C. *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. **Genomics**, v.10, p.217, 2009.
- MÜNZ C. Enhancing immunity through autophagy. **Annual Review of Immunology**, v.27, p.423-49, 2009.
- MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Crutice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systems Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.
- NAPPI, A. J. Insect Hemocytes and the Problem of Host Recognition of Foreignness. **Contemporary Topics in Immunobiology**, v.4, p.207-224, 1974.
- NAPPI, A. J. et al. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. **European Journal of Cell Biology**, v. 68, p. 450– 456, 1995.
- NAPPI, A. J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioessays**, v. 22, p. 469–480, 2000.
- NATION, J.L. **Insect Physiology and Biochemistry**. 3. Ed. University of Florida, Gainesville, 2016. 672p.
- NEGREIRO, M. C. C., ANDRADE, F. G., FALLEIROS, A. M. F. Sistema imunológico de defesa em insetos: Uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina: Ciências Agrárias**, v.25(4), p. 293–308, 2004.

NEWMAN, S. L., L. GOOTEE, J. HILTY, AND R. E. MORRIS. Human macrophages do not require phagosome acidification to mediate fungistatic/fungicidal activity against *Histoplasma capsulatum*. *Journal of Immunology*, v.176, p.1806-1813, 2006.

NIEUW- AMEROGEN, A.V., VEERMAN, E.C.I. Salivary glands and saliva. number 2. Saliva the defender of the oral cavity. **Oral Diseases**, v. 8, p.12-22, 2002.

OJEDA-CHI, M.M., RODRIGUEZ-VIVAS, R.I., GALINDO-VELASCO, E., LEZAMA-GUTIERREZ, R. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v.170, p.348–354, 2010.

ORTIZ-URQUIZA, A., KEYHANI, N.O. (2013) Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. **Insects**, v.4, p.357–374, 2013.

PATARROYO, J.H., PORTELA , R.W., DE CASTRO, R.O., COUTO PIMENTELA, J., GUZMAN, F., PATARROYO, M.E., VARGAS, M.I., PRATES, A.A., DIAS MENDES, M.A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.88, p.163-172, 2002.

PEDRINI, N., CRESPO, R., JUAREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology**. v. 146, p. 124-137, 2007.

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.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; GOLO, P. S.; QUINELATO, S. B.; CAMARGO, M. G.; SA, F. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 257- 260, 2012.

POLAR, P., MOORE, D., KAIRO, M.T.K., RAMSUBHAG, A. Topically applied mycoacaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. **Experimental and Applied Acarology**, v.46, p. 119-148, 2008.

PUTTER, J.S., SEGHATCHIAN, J. Cumulative erythrocyte damage in blood storage and relevance to massive transfusions: selective insights into serial morphological and biochemical findings. **Blood Transfusion**, v.15, p.348–56, 2017.

QUESADA-MORAGA, E., LANDA, B.B., MUNOZ-LEDESMA, J., JIMENEZ-DIAZ, R.M., SANTIAGO-ALVAREZ, C. Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. **Mycopathologia**, v.161, p.323–329, 2006.

RATCLIFFE, N.A., GÖTZ, P. Functional studies on insect haemocytes, including non-self recognition. **Research in Immunology**, v.141, p. 919-922, 1990.

ROBERTS, D.W.; ST. LEGER, R.J. *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in applied microbiology**, v. 54, p. 1-70, 2004.

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.

ROT, A., GINDIN, G., MENT, D., MISHOUTCHENKO, A., GLAZER, I., SAMISH, M. On-host control of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae) by

- Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae). **Veterinary Parasitology**, v.193, p.229–237, 2013.
- SAMISH, M., ROT, A., MENT, D., BAREL, S., GLAZER, I., GINDIN, G. Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v.206(3), p. 258-266, 2014.
- SAMPAIO, I.B.M., 2002. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**, FEPMVZ-Editora, Belo Horizonte.
- SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* s.l. enzymes and toxins. **Toxicon**. v. 56, p. 1267-1274, 2010.
- SCHAWARTZ, J.L., PATTERSON, G.H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. **Science**, v.300, p.87-91, 2003.
- SEVIM, A., DONZELLI, B.G.G., WU, D., DEMIRBAG, Z., GIBSON, D.M., TURGEON, B.G. Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. **Current Genetics**, v.58, p. 79–92, 2012.
- SHIMOMURA, O. The Discovery of aquorin and green fluorescent protein. **Journal of Microscopy**, v.217, p. 3-15, 2005.
- SHUAI, K., ZIEMIECKI, A., WILKS, A. F., HARPUR, A. G., SADOWSKI, H. B., GILMAN, M. Z., et al. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. **Nature**, v. 366, p.580–583, 1993.
- SIDERI, M., TSAKAS, S., MARKOUTSA, E., LAMPROPOULOU, M., MARMARAS, V. J. Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. **Immunology**, v.123, p.528–537, 2008.
- SILVA, S.B., SAVASTANO, G., BITTENCOURT, V.R.E.P. Tipos celulares envolvidos na resposta imune de fêmeas de *Boophilus microplus* inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Penicillium* sp. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.15, p. 128-131, 2006.
- SHRESTHA, S., PARK, J., AHN, S.J., KIM, Y. Pge2 mediates oenocytoid cell lysis via a sodium-potassium-chloride cotransporter. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.89, p. 218-229, 2015.
- SMITH, A.A., PAL, U. Immunity-related genes in *Ixodes scapularis* – perspectives from genome information. **Microbiology**, v.4, p. 116, 2014.
- SOCOLOVSCHI, C., MEDIANNIKOV, O., RAOULT, D., PAROLA, P. The relationship between spotted fever group rickettsiae and ixodid ticks. **Veterinary Research**, v.40, p. 34, 2009.
- SOJKA D., FRANCISCHETTI I. M., CALVO E., KOTSYFAKIS M. Cysteine proteases from bloodfeeding arthropod ectoparasites. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.712, p.177–191, 2011.
- 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., ROE, R.M. **Biology of ticks**. 2 Ed., Oxford University Press. 2014. 560p.

- SPELLIG, T., BOTTIN, A., KAHMANN, R. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 252, p.503-509, 1996.
- STERBA, J., DUPEJOVA, J., FISER, M., VANCOVA, M., GRUBHOFFER, L. Fibrinogen-related proteins in ixodid ticks. **Parasites and Vectors**, v.4, p.127, 2011.
- STOEPLER, T.M., CASTILLO, J.C., LILL, J.T., ELEFThERIANOS, I. Hemocyte density increases with developmental stage in an immune-challenged forest caterpillar. **PLoS One**, v.8, p. e70978, 2013.
- TAN, J., XU, M., ZHANG, K., WANG, X., CHEN, S., LI, T., XIANG, Z., CUI, H. Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, v.59, p. 595-603, 2013.
- THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Industrial Biotechnology**, v.2, p. 194-208, 2006.
- THANNICKAL, V.J., FANBURG, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, p. L1005-L1028, 2000.
- THEOPOLD, U., SCHMIDT, O., SÖDERHÄLL, K., DUSHAY, M.S. Coagulation in arthropods: defense, wound closure and healing. **Trends Immunology**, v.25, p. 289-294, 2004.
- TSAKAS, S., MARMARAS, V. Insect immunity and its signaling: an overview. p.228–238, 2010.
- VEGA, F.E., GOETTEL, M.S., BLACKWELL, M., CHANDLER, D., JACKSON, M.A., KELLER, S., KOIKE, M., MANIANIA, M., MONZÓN, A., OWNLEY, B.H., PELL, J.K., RANGEL, D.E.N., ROY, H.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, p.149–159, 2009.
- WANDURSKA-NOWAK, E. The role of nitric oxide (NO) in parasitic infections. **Wiadomości Parazytologiczne**, v.50, p.665–678, 2004.
- WANG, C.; ST. LEGER, R. J. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. **Eukaryotic Cell**. v. 6, p. 808-816, 2007.
- WANG, C., ST. LEGER, R.J. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p. 6647–6652, 2006.
- WHARTON, R. H. Control of arthropods of medical and veterinary importance. **New York, Plenum Publishing**, p. 36-52, 1974.
- WIEGAND, C., LEVIN, D., GILLESPIE, J.P., WILLOTT, E., KANOST, M.R., TRENCZEK, T. Monoclonal antibody M13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 45, p. 95-108, 2000.
- ZHOU J., UEDA M., UMEMIYA R., BATTSETSEG B., BOLDBAATAR D., XUAN X. A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns

in relation to innate immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.36, p. 527–535, 2006.