

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

DISSERTAÇÃO

Influência da dopamina na resposta imune celular de
Rhipicephalus microplus **inoculados com**
Metarhizium anisopliae

Thaís Almeida Corrêa

2021



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

**INFLUÊNCIA DA DOPAMINA NA RESPOSTA IMUNE CELULAR DE
Rhipicephalus microplus INOCULADOS COM *Metarhizium anisopliae***

THAÍS ALMEIDA CORRÊA

Sob a Orientação da Professora
Patrícia Silva Gôlo

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

Seropédica, RJ
Agosto de 2021

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

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

C824i Corrêa, Thaís Almeida, 1991-
Influência da dopamina na resposta imune celular
de *Rhipicephalus microplus* inoculados com *Metarhizium*
anisopliae / Thaís Almeida Corrêa. - Rio de Janeiro,
2021.
44 f.: il.

Orientadora: Patrícia Silva Gôlo.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, 2021.

1. Fungos entomopatogênicos. 2. Carrapatos dos
bovinos. 3. Resposta imune. 4. Parasitologia
Veterinária. I. Gôlo, Patrícia Silva, 1987-, orient.
II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias III.
Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 3769/2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.061446/2021-76

Seropédica-RJ, 27 de agosto de 2021.

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

THAÍS ALMEIDA CORRÊA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/08/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da dissertação.

(Assinado digitalmente em 27/08/2021 11:29)

ISABELE DA COSTA ANGELO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: 2860277

(Assinado digitalmente em 27/08/2021 11:18)

PATRICIA SILVA GOLO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: 2221855

(Assinado digitalmente em 27/08/2021 11:28)

DANIELE PEREIRA DE CASTRO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 849.375.801-91

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **3769**, ano: **2021**, tipo: **ATA**, data de emissão: **27/08/2021** e o código de verificação: **b844e92809**

“Acredite mais em você. Confie e faça acontecer!”.

(Telma Dantas)

*Dedico este trabalho à minha mãe Telma e aos meus avós
Alfredo e Georgina por todo esforço e dedicação para que eu
pudesse realizar todos os meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à *Deus*, por todo amor, cuidado e pelo amparo ao longo desta jornada. Obrigada por nunca esquecer de mim! Agradeço à intercessão de *Nossa Senhora Aparecida, São Jorge, São Cosme e São Damião* diante de minhas orações.

À minha querida mãe *Telma Dantas*, minha melhor amiga, por todas as nossas lutas e conquistas, muito obrigada por tudo mãe! Aos meus avós, *Alfredo Almeida e Georgina Dantas*, agradeço pelo amor incondicional e por todo apoio. O meu muito obrigada às três pessoas mais importantes da minha vida pelo incentivo à minha educação e por sonharem comigo todos os meus sonhos. Vocês são o meu maior presente e sempre serão meu maior motivo para seguir em frente. Sempre será para vocês e por vocês! Amo vocês!!!

Agradeço à toda minha família, em especial às minhas tias *Tânia Almeida, Jaciara Almeida e Jacira Almeida* e aos meus primos por todo apoio, incentivo e pelo carinho e cuidado que vocês sempre acompanharam todos os momentos de minha vida.

Ao meu melhor amigo e namorado *Felipe Suzuki*, agradeço por todo carinho, compreensão, companheirismo e por todos: “Vai dar certo, fica calma!”. Você é meu ponto de paz e equilíbrio. Eu te amo!

À minha orientadora e professora *Patrícia Gôlo*, a quem admiro muito, obrigada pela atenção, paciência, incentivo que destina aos seus alunos e por compartilhar conosco todo seu amor pela ciência. Você nos inspira muito! Aproveito para agradecer também toda sua sensibilidade nos momentos difíceis que passei durante a pandemia.

À minha amiga *Jéssica Fiorotti* obrigada por dividir comigo toda sua experiência sobre sistema imune. Durante todo tempo, mesmo quando estava na República Tcheca, você sempre dedicou a mim e a esse trabalho toda sua atenção. Obrigada por tudo amiga!

Agradeço à toda equipe do *Laboratório de Controle Microbiano*, as professoras *Vânia Bittencourt e Isabele Angelo*, aos alunos de pós-graduação e alunos de iniciação científica. Sempre serei grata ao LCM por tudo! Eu tenho muito orgulho de fazer parte desta família.

Aos meus amigos da Pós-graduação e do laboratório desde a minha iniciação científica, *Emily Mesquita, Mariana Camargo, Caio Júnior, Allan Felipe, Laura Nóbrega, Adriani Carneiro, Amanda Corval e Ricardo Bittencourt*, obrigada por toda ajuda nos experimentos (inclusive de madrugada e nos finais de semana!) e por compartilharem comigo todas as alegrias e perrengues da pós.

À minha amiga *Thayse Machado*, minha irmã ruralina, que compartilha comigo momentos tão importantes desde a graduação. Obrigada por toda força, incentivo e todo carinho que dedica a nossa amizade.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

E a todos que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente nesta jornada e principalmente nesta etapa tão importante da minha vida.

Gratidão a todos vocês!

BIOGRAFIA

Thaís Almeida Corrêa, filha de Telma Dantas dos Santos Almeida e Amauri dos Santos Corrêa, nasceu em 15 de novembro de 1991, no município do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Estudou de 2002 a 2008, na Escola São Sebastião localizada no município do Rio de Janeiro-RJ, tendo concluído o ensino médio no ano de 2008.

Em Fevereiro de 2013 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído o mesmo em Dezembro de 2018. Em 2015, no Laboratório de Controle Microbiano da mesma Universidade, sob orientação da professora Patrícia Silva Gôlo, tornou-se bolsista de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq). Durante 4 anos de Iniciação Científica trabalhou com isolamento de fungos entomopatogênicos do solo, participou de diversas jornadas de iniciação científica, apresentação em congressos e simpósios da área e publicou junto ao grupo em revistas especializadas.

Em março de 2019 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (PPGCV) permanecendo orientada pela Dra. Patrícia. Durante todo o período de vida acadêmica, participou de um Simpósio na área de pesquisa (16º SINCOBIOL), cursos de aperfeiçoamento (IX CBAV) e publicou junto ao grupo de pesquisa resumos e trabalhos científicos.

RESUMO

CORRÊA, Thaís Almeida. **Influência da dopamina na resposta imune celular de *Rhipicephalus microplus* inoculados com *Metarhizium anisopliae*** 2021. 32p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Atualmente, o controle de *Rhipicephalus microplus* é amplamente realizado por meio do uso de acaricidas químicos, porém o uso indevido desses produtos contribui para o desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes, contaminação de produtos de origem animal e do meio ambiente por seus resíduos. Diante dessa situação, o controle biológico por fungos entomopatogênicos é uma alternativa promissora e que pode ser utilizada no manejo integrado para o controle de carrapatos. *Metarhizium* spp. é um dos fungos utilizados com reconhecida atuação no controle biológico de artrópodes. Em resposta à infecção pelo fungo, os artrópodes ativam respostas imunológicas dos carrapatos contra patógenos. No entanto, é necessário um conhecimento mais aprofundado sobre o papel do sistema imunológico de *R. microplus* e seus mecanismos de defesa contra uma infecção fúngica para avançar no desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes contra o parasita. A dopamina (DA) é uma monoamina biogênica que interliga os sistemas nervoso e imunológico, relatada para modular a fagocitose de hemócitos de insetos. O presente estudo avaliou o efeito da DA na resposta imune celular e sobrevivência de *R. microplus* inoculado com blastosporos de *M. anisopliae*. Os seguintes grupos foram formados: C (grupo não tratado), P (carrapatos inoculados com solução tampão de fosfato), D (carrapatos inoculados com 3µL de 1.025 ng/µL DA), Ma [carrapatos inoculados com *M. anisopliae* (3µL; 10⁶ blastosporos/mL)], e DM [carrapatos inoculados com DA (3µL; 1.025 ng/µL) e após 20 minutos, *M. anisopliae* (3µL; 10⁶ blastosporos/mL)]. E somente C, P e D para o ensaio de fagocitose. Ao analisar os efeitos da inoculação de a DA exógena: aumentou a sobrevivência das fêmeas após serem inoculadas com dopamina em associação ao fungo 72h após o tratamento; aumentou o número de hemócitos circulantes no grupo DA seguida ou não da infecção fúngica 24h após a inoculação; não influenciou o índice fagocítico de hemócitos de carrapatos desafiados com *M. anisopliae*; influenciou a atividade da fenoloxidase na hemolinfa onde carrapatos inoculados com DA e o fungo ou exclusivamente com DA foi maior do que em carrapatos não tratados ou inoculados apenas com o fungo, 72 h após o tratamento; foi possível detectá-la nos hemócitos de carrapatos tratados e não tratados com fungo. A análise da resposta imune de *R. microplus* desafiada com fungos entomopatogênicos contribui para o avanço e desenvolvimento de novas estratégias eficazes de controle biológico. Nosso estudo demonstrou pela primeira vez o sistema imune de *R. Microplus* sendo modulado pela ação da DA exógena

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos, carrapatos dos bovinos, resposta imune

ABSTRACT

CORRÊA, Thaís Almeida. **Influence of dopamine on the cellular immune response of *Rhipicephalus microplus* inoculated with *Metarhizium anisopliae*.** 2021. 32p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Currently, the control of *Rhipicephalus microplus* widely performed through the use of chemical acaricides, but the misuse of these products contributes to the development ticks' populations more resistant, contamination of animal products, and the environment by their residues. In this situation, biological control by entomopathogenic fungi is a promising alternative that can be used in integrated management to control ticks. *Metarhizium* spp. is one of the fungi used with recognized performance in the biological control of arthropods. In response to fungal infection, arthropods activate tick immune responses against pathogens. However, a greater understanding is needed of the role of the *R. microplus* immune system and its defense mechanisms against a fungal infection is needed to advance in the development of more effective control against the parasite. Dopamine (DA) is a biogenic monoamine that interconnects the nervous and immune systems, reported to modulate the phagocytosis of insect hemocytes. The present study evaluated the effect of DA in the cellular immune response and survival of *R. microplus* inoculated with *M. anisopliae* blastospores. The following groups were formed: C (untreated group), P (ticks inoculated with phosphate buffer solution), D (ticks inoculated with 3 μ L of 1.025 ng μ L⁻¹ DA), M [ticks inoculated with *M. anisopliae* (3 μ L; 10⁶ blastospores mL⁻¹)], and DM [ticks inoculated with DA (3 μ L; 1.025 ng μ L⁻¹) and after 20 min, *M. anisopliae* (3 μ L; 10⁶ blastospores mL⁻¹ And only C, P, and D for the phagocytosis assay. By analyzing the effects of exogenous DA inoculation: it increased the survival of females after being inoculated with dopamine in association with the fungus 72h after treatment; increased the number of circulating hemocytes in the group inoculated with DA followed or not by fungal infection 24h after inoculation; did not influence the phagocytic index of hemocytes of ticks challenged with *M. anisopliae*; influenced the activity of phenoloxidase in hemolymph where ticks inoculated with DA and the fungus or exclusively with AD was higher than in untreated or only ticks inoculated with the fungus, 72 h after treatment; it was possible to detect it in hemocytes of ticks treated and not treated with fungus. The analysis of the immune response of *R. microplus* challenged with entomopathogenic fungi contributes to the advancement and development of new effective biological control strategies. Our study demonstrated for the first time the immune system of *R. Microplus* being modulated by the action of exogenous DA

Keywords: Entomopathogenic fungi, bovine tick, immune response

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de receptores estimulatórios e inibitórios de dopamina (DA). (A) Receptores de DA em vertebrados (B) Receptores de DA em insetos que regulam o AMP cíclico intracelular (C) Receptores de dopamina em glândula salivar de *Ixodes scapularis*.....12

Figura 2: Efeito da dopamina na sobrevivência de *Rhipicephalus microplus* inoculados com *Metarhizium anisopliae*. Porcentagem da média de sobrevivência e o erro padrão de fêmeas de *R. microplus* inoculadas com blastosporos de *M. anisopliae* (10^6 blastosporos/mL) e com dopamina (1.025 ng/ μ L) de acordo com o Log-rank ($P < 0,0001$). Experimento representativo de duas repetições independentes, onde (*) representa a diferença estatística entre o grupo DM e os grupos de controle ($P = 0,0012$) e (**) a diferença entre o grupo M e os grupos de controle ($P < 0,0001$). C: carrapatos não tratados; P: carrapatos inoculados com solução tampão de fosfato; D: carrapatos inoculados com dopamina; M: carrapatos inoculados com *M. anisopliae*; DM: carrapatos inoculados com dopamina e o fungo.....17

Figura 3: Contagem de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* após inoculação de dopamina e *Metarhizium anisopliae*. Número médio e erro padrão de hemócitos/mL de hemolinfa de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* 24h após inoculação com blastosporos de *M. anisopliae* (10^6 blastosporos/mL) e com dopamina (1.025 ng/ μ L). Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Experimento representativo de duas repetições independentes, totalizado n de 120 carrapatos. C: carrapatos não tratados; P: carrapatos inoculados com solução tampão de fosfato; D: carrapatos inoculados com dopamina; M: carrapatos inoculados com *M. anisopliae*; DM: carrapatos inoculados com dopamina e o fungo..... 18

Figura 4: Índice fagocítico de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* após incubação com blastosporos de *Metarhizium anisopliae* ou *Saccharomyces cerevisiae* (Zymozan A[®]). Os hemócitos foram coletados de fêmeas de carrapatos não tratadas (C), carrapatos previamente inoculados com tampão fosfato (P) ou (D) dopamine (1.025 ng/ μ L). Os dados foram apresentados em média e erro padrão. O índice fagocítico foi determinado com o número de hemócitos exibindo fagocitose por 100 hemócitos representativos de três repetições independentes e triplicate, totalizando 90 carrapatos. Barras seguidas da mesma letra não difrem estatisticamente seguidos pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ($P < 0,05$).....19

Figura 5: Atividade da fenoloxidase (U) na hemolinfa de *Rhipicephalus microplus* em diferentes tempos de inoculação de dopamina e *Metarhizium anisopliae*. Os dados foram representados como média e erro padrão de atividade de fenoloxidase de hemolinfa de carrapatos 24, 48 e 72h após inoculação com blastosporos de *M. anisopliae* (10^6 blastosporos/mL) e com dopamina (1.025 ng/ μ L). Dados representativos de duas repetições independentes e triplicate, totalizado n de 54 carrapatos. Barras com a mesma letra não diferiram estatisticamente após two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). C: carrapatos não tratados; P: carrapatos inoculados com solução tampão de fosfato; D: carrapatos inoculados com dopamine (1.025 ng/mL); M: carrapatos inoculados com *M.*

anisopliae (10^6 blastosporos/mL); **DM**: carrapatos inoculados com dopamina e o fungo.....20

Figura 6: Presença de dopamina nos hemócitos de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus microplus* após 24h de inoculação de dopamina e *Metarhizium anisopliae*. A dopamina foi visualizada em microscópio de fluorescência BX 51 (Olympus®) nos hemócitos (Alexa Fluor 594; vermelho). Os núcleos foram contrastados com DAPI (azul). **(A)** carrapatos não tratados **(C)**; **(B)** carrapatos inoculados com dopamina **(D)**; **(C)** carrapatos inoculados com blastosporos de *Metarhizium anisopliae* **(M)**; **(D)** carrapatos inoculados com dopamina e blastosporos de *M. anisopliae* **(DM)**. A barra de escala representa 10 μ m. Foram analisados hemócitos da hemolinfa de 25 carrapatos em cada tratamento. Barra de escala = 10 μ m.....21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.2 Controle Biológico Utilizando Fungos Entomopatogênicos	4
2.3 Sistema Imune Humoral de Artrópodes	7
2.4 Sistema Imune Celular.....	8
2.5 Sistema Imune Humoral.....	9
2.6 Monoamina biogênica - Dopamina	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Localização e Realização dos Experimentos.....	13
3.2. Obtenção de <i>Rhipicephalus microplus</i>	13
3.3 Fungo Entomopatogênico.....	13
3.4 Efeito da Dopamina na Sobrevivência de Carrapatos Tratados com <i>M. anisopliae</i>	14
3.5 Quantificação de Hemócitos após Inoculação de <i>M. anisopliae</i>	14
3.6 Ensaio Fagocítico <i>in vitro</i>	14
3.7 Atividade Fenoxidase na Hemolinfa de <i>R. microplus</i> Inoculados com <i>M. anisopliae</i>	15
3.8 Detecção de Dopamina em Hemócitos de <i>R. microplus</i> Tratados com <i>M. anisopliae</i>	15
3.9 Análise Estatística	16
4 RESULTADOS	17
4.1.Efeito da Dopamina na Sobrevivência de Carrapatos Tratados com <i>M. anisopliae</i>	17
4.2 Quantificação de Hemócitos após Inoculação de <i>M. anisopliae</i>	17
4.3 Ensaio Fagocítico <i>in vitro</i>	18
4.4 Atividade Fenoxidase na Hemolinfa de <i>R. microplus</i> Inoculados com <i>M. anisopliae</i>	19
4.5 Detecção de dopamina em Hemócitos de <i>R. microplus</i> Tratados com <i>M. anisopliae</i>	20
5 DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÕES	25
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são ectoparasitas sugadores de sangue que podem transmitir agentes patogênicos a humanos e animais. Os carrapatos *Rhipicephalus microplus* são considerados uma grande preocupação para os criadores de gado em áreas tropicais. Essa espécie de carrapato causa perdas econômicas estimadas em 3,24 bilhões de dólares por ano apenas no Brasil. Essas perdas são decorrentes da mortalidade do gado, menor valor de mercado do couro, redução do ganho de peso, produção de leite e carne. O uso inadequado de acaricidas químicos para o controle desse carrapato aumenta a preocupação com os riscos à saúde humana e ambiental e a seleção de populações resistentes de carrapatos. Sendo assim, é interessante procurar novas formas de controle e o uso de manejo integrado de pragas.

O uso de fungos entomopatogênicos como controle biológico de carrapatos, especificamente *Metarhizium* e *Beauveria*, têm demonstrado uma boa alternativa. Esses fungos infectam o artrópode alvo ao entrar em contato com seus propágulos para penetrar ativamente na cutícula do hospedeiro por meio de atividades enzimáticas e físicas do fungo.

Quando os artrópodes são desafiados com patógenos, sua resposta imunológica é ativada. Essa resposta pode ser classificada como resposta humoral e celular. A resposta humoral envolve processos de reconhecimento de moléculas microbianas, modulação, ativação de moléculas efetoras (peptídeos antimicrobianos e cascatas de melanização) e reposição de moléculas relacionadas a via Toll e a via Imd. Enquanto a resposta imune celular envolve hemócitos e reações inespecíficas, como fagocitose, nodulação e encapsulação.

Recentemente, foi avaliado o impacto da infecção por *Metarhizium* nos hemócitos de carrapatos, sugerindo atividade citotóxica e fagocitária após a infecção. No entanto, ainda existem lacunas em relação ao processo de infecção e resposta do carrapato ao desafio OU à infecção por fungos entomopatogênicos.

Existem várias estratégias na resposta imune dos hospedeiros artrópodes para prevenir a morte celular. Uma delas é a conexão entre o sistema imunológico e o nervoso. O sistema nervoso integra as informações sensoriais e as envia para outros sistemas, incluindo o sistema imunológico. Ligando os sistemas nervoso e imunológico estão as monoaminas biogênicas, como a dopamina (DA). A sinalização DA pode contribuir para a ativação precoce dos hemócitos dos insetos. A DA sintetizado e liberado pelos hemócitos em insetos pode atuar de forma autócrina apoiando ou estimulando a atividade fagocítica, aumentando o número total de hemócitos. Outro papel do DA está relacionado à secreção salivar dos carrapatos. O DA é

conhecido por ser um potente ativador da salivação, atuando por meio de dois receptores diferentes. Em *Ixodes scapularis*, a secreção salivar desempenha um papel crucial afetando o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado.

A atividade da fenoloxidase é um importante processo da resposta imune dos invertebrados é mediada pela atividade da fenoloxidase (PO) nos hemócitos. Em insetos, a ativação da PO desempenha um papel importante na cicatrização de feridas e no reconhecimento de material estranho durante o encapsulamento e melanização. Além de seu papel fundamental na resposta imune imediata em insetos, a melanina participa da esclerotização e pigmentação da cutícula. A produção de melanina pela ação da PO envolve a conversão de tirosina em DA. A atividade PO foi estudada em *Ornithodoros moubata* e em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. A atividade da PO na hemolinfa de carrapatos ixodídeos requer investigação, principalmente em relação ao efeito da dopamina na PO em carrapatos infectados por fungos entomopatogênicos. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da inoculação da DA em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, associada ou não, à blastosporos de *Metarhizium anisopliae* em relação à susceptibilidade das fêmeas em relação ao propágulo fúngico durante 24, 48 e 72hs, analisar a atividade fagocítica dos hemócitos 24h após a inoculação, avaliar a atividade da enzima fenoloxidase 24, 48 e 72hs após a inoculação e na detecção da presença de dopamina em hemócitos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

Rhipicephalus microplus Canestrini, 1888 (Acari: Ixodidae) é um artrópode ectoparasita dos bovinos, seu principal hospedeiro. Pertencem à classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida e família Ixodidae (PEÑALVER et al., 2017). Nota-se a ocorrência deste carrapato na América do Sul, América Central, África e Austrália que caracterizam-se como sendo regiões de clima de clima tropical e subtropical (GONZÁLES, 2002).

Primeiramente descrita como *Boophilus microplus*, esta espécie foi submetida a estudos complementares, onde após técnicas morfológicas e sequenciamento genético o gênero *Boophilus* tornou-se subgênero do gênero *Rhipicephalus* (MURREL; BARKER, 2003).

Esta espécie de carrapato apresenta um único hospedeiro durante sua fase parasitária, caracterizando-a como monóxeno (MONTEIRO, 2017). Em contato com o corpo do hospedeiro, se fixam nas regiões mais quentes e sensíveis do animal. As larvas passam a ninfas e posteriormente a adultos, macho e fêmea. Acontece a cópula e as fêmeas ingerem sangue até seu completo ingurgitamento, quando se desprendem do hospedeiro e caem ao solo, neste momento se inicia a fase de vida livre ou não parasitária. Cerca de três dias após a queda, inicia-se a postura dos ovos, que eclodem dando origem a larvas que migram para o ápice das pastagens à espera de seu hospedeiro. Este fato acontece cerca de 7 a 10 dias após a eclosão (FURLONG; PRATA, 2005).

Desde 2020, o Brasil ocupa papel de destaque com o maior rebanho bovino do mundo, com 217 milhões de cabeças, representando 14,3% do rebanho mundial. E também é uma das principais referências mundiais em pecuária de corte, exportando 2,2 milhões de toneladas. (EMBRAPA, 2020). Esses dados ressaltam a importância do controle parasitário de *R. microplus* devido aos prejuízos econômicos estimados por Grisi e colaboradores (2014), como sendo de 3,24 bilhões de dólares ao ano apenas no Brasil. A presença deste artrópode afeta negativamente a produtividade de carne e leite (KLAFKE et al., 2012; KERNIF et al., 2016) Além disso, devido aos seus hábitos hematófagos predispõe os animais a danos como espoliação do couro, anemia, estresse, infecções secundárias (RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2017) e transmissão de patógenos como os hemoparasitas causadores da Tristeza Parasitária Bovina, protozoários do gênero *Babesia* spp. (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e Anaplasmoze bovina causada por bactérias do gênero *Anaplasma* spp (*Anaplasma marginale*) (FURLONG; PRATA, 2005).

A principal e mais utilizada forma de controle deste carrapato é realizada através dos acaricidas de bases químicas que ocorre desde 1985, com compostos químicos que incluem organofosforados, amidinas, piretróides, fenilpirazóis, cimiazol, spinosad (acaricidas de contato), lactonas macrocíclicas, fenilpirazoles (sistêmicos) (HIGA, et al., 2015) e, mais recentemente, fluazuron (RECK et al., 2014). A resistência aos acaricidas se construiu ao longo de anos. Vários fatores justificam este processo, entre eles: uso prolongado do produto, aplicação inadequada (KLAFKE et al., 2012; 2017; RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2017), ausência de levantamento epidemiológico e políticas públicas que direcionem um apoio técnico ao produtor. É claramente necessário detectar a resistência precocemente e usar acaricidas corretamente, especialmente considerando que está se tornando cada vez mais difícil desenvolver novas moléculas capazes de exercer controle eficiente (HIGA, et al., 2015).

Desta forma a utilização do controle biológico com fungos entomopatogênicos apresenta-se como um método de controle de *R. microplus* promissor (CAMARGO et al. 2014; 2016; FERNÁNDEZ-SÁLAS et al. 2017; BERNARDO et al. 2018; MASCARIN et al., 2019; MARCIANO et al., 2021) devido ao seu expressivo potencial como estratégia de controle e redução da população de artrópodes. E associado a isto, não afetam a produção animal de carne e leite (GOMEZ-PEREZ et al., 2014), a saúde animal e o meio ambiente, ao contrário das diferentes bases químicas cujos resíduos não são decompostos na natureza (BANUMATHI et al., 2017).

2.2 Controle Biológico Utilizando Fungos Entomopatogênicos

O controle biológico atua através de inimigos, como predadores e patógenos, naturais para controle de populações anteriormente elevadas (SILVA et al., 2006). Pode ocorrer de forma natural, sem a interferência humana ou através do seu uso aplicado pela biotecnologia por intermédio de fungos, bactérias, nematóides e protozoários (VALICENTE, 2009).

A utilização do controle biológico não é uma técnica recente. Desde o século III a.C., formigas predadoras eram utilizadas pelos chineses para controlar pragas em plantas cítricas (SILVA et al., 2006; FINKLER, 2012), e na Arábia medieval os agricultores transportavam colônias dessas mesmas formigas para controle de formigas fitófagas em palmáceas (CARVALHO, 2006).

Os fungos entomopatogênicos fazem parte de conjunto de micro-organismos que podem agir em uma gama de hospedeiros desempenhando um papel vital nas dinâmicas das

populações e foram os primeiros bioagentes a serem aplicados no controle microbiano de insetos (FINKLER, 2012; MAINA et al., 2018). O termo “entomopatogênico” refere-se aos micro-organismos capazes de reduzir as populações de insetos usando-os como hospedeiros para desenvolver parte do seu ciclo de vida sem causar danos econômicos às culturas e com alta capacidade de esporulação e sobrevivência (DEVOTTO; GERDING; FRANCE, 2000; SCHOLTE et al., 2004). Estes fungos se diferem, principalmente, por apresentarem grande diversidade filogenética (PÉREZ-GONZÁLEZ et al., 2004).

As pesquisas com fungos entomopatogênicos no Brasil iniciaram em 1923, quando foram identificadas duas espécies de cigarrinhas infectadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. O fungo foi utilizado para combater a cigarrinha das raízes (*Tomaspis liturata*), no primeiro trabalho de pulverização realizada no país (ALVES; FARIA, 2010). Na década de 40, os fungos entomopatogênicos voltaram a ser objeto de estudo em Sergipe, na busca pelo controle de cigarrinhas na cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (DALZOTO; UHRY, 2009). De Faria e Wraight (2007), identificaram 171 produtos baseados em fungos usados como agentes de biocontrole desde 1960, a maioria deles com *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *M. anisopliae* e *Isaria fumosorosea*.

Ácaros e carrapatos também são suscetíveis a fungos entomopatogênicos (CHANDLER et al., 2000). *M. anisopliae* sensu lato (s.l.) e *B. bassiana* são os fungos mais comumente investigados como agentes biológicos de controle de carrapatos (FERNANDES et al., 2012).

O fungo entomopatogênico *Metarhizium* spp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) é um patógeno que tem predileção natural por mais de 300 espécies de insetos integrantes de diferentes ordens (DEVOTTO et al., 2000). Este gênero caracteriza-se microscopicamente por apresentar conidióforos com manchas compactas ou individuais, células conidiogênicas geralmente têm um ápice arredondado a cônico, densamente ramificado ou densamente entrelaçado; os conídios são asseptados, cilíndricos ou ovoides formando cadeias, podem ser hialinos ou pigmentados de verde oliva (HUMBER, 2012). As espécies deste gênero são consideradas como saprófitos do solo e estabelecem uma relação ecológica com as plantas presentes, sendo assim caracterizado como fungo endofítico e rizosfera-competente (ST. LEGER, 2008). Além disso, estudos sugerem que esses fungos podem formar associações com as raízes das plantas (HU; ST; LEGER, 2002).

O processo de infecção, segundo VEGA et al. (2012), ocorre a partir da adesão dos esporos na cutícula do hospedeiro, onde a inoculação ocorre por contato direto entre

cadáveres infecciosos e hospedeiros suscetíveis, ou indiretamente através de esporos no ar ou esporos depositados sobre a vegetação ou partículas de solo (HESKETH et al., 2010). Em segundo lugar, a germinação ocorre quando o conídio encontra condições favoráveis de umidade, temperatura, fatores físicos e químicos e exigências nutricionais na cutícula podendo produzir estruturas de penetração como tubos germinativos e apressórios ou uma substância mucilaginosa que prende para iniciar a formação do tubo germinativo que penetra através dos poros ou as camadas mais externas da epicutícula (SHAH; PELL, 2003). Em seguida, as células fúngicas realizam a penetração na hemocele, onde a maioria dos fungos realiza transição dimórfica de micélio a levedura (Entomophthorales), em outros termos muitas vezes prescindem da formação de parede celular e se desenvolvem (blastosporos), evitando o reconhecimento por hemócitos circulantes na hemocele. As vantagens desta forma celular são o aumento das taxas de aquisição de nutrientes, além de que as células fúngicas podem-se multiplicar na hemocele, sem ser detectadas pelo sistema imunológico do artrópode que utiliza epítomos de parede celular como detectores.

Uma vez dentro do carrapato, os fungos têm que lidar com os mecanismos de resposta do sistema imune para a qual se desenvolveram estratégias defensivas e imunossupressoras. Como a produção de proteases que degradam o sistema imune humoral, produção de depsipeptídeos cíclicos como as destruxinas que causam paralisia pela sua capacidade de abrir os canais de cálcio, assim como outras toxinas que danificam o sistema muscular e túbulos de Malpighi, afetando a excreção e dificultando sua capacidade de mover-se ou também por alterações estruturais na parede celular (PAL; ST LEGER; WU, 2007).

Finalmente, quando as condições de temperatura e umidade são favoráveis, as hifas conseguem atravessar o tegumento do inseto ocorrendo emergência do fungo em direção ao exterior, onde podem permanecer na fase vegetativa e começar o processo de esporulação (fase reprodutiva) dentro de 24 a 48h, dependendo da umidade relativa e síntese de antibióticos para evitar o crescimento de organismos oportunistas (DEVOTTO et al., 2000). As hifas formam conidióforos dando origem a esporos assexuais (conídios) que são unidades infectivas com função de disseminação (SHAH; PELL, 2003).

A fim de aumentar a eficácia da utilização de agentes fúngicos no controle biológico de carrapatos em condições naturais é necessário considerar a seleção de isolados eficazes (alta virulência, tolerância a altas temperaturas, radiação ultravioleta e dessecação) (FERNANDES; BITTENCOURT; ROBERTS, 2012). Aliado a estes fatores, também é importante a implementação de tecnologias de produção em massa e uma estratégia de

formulação eficaz contribuem para o uso efetivo dos microorganismos em programas de controle de insetos praga (MARCIANO et al., 2021). Existem disponíveis no mercado produtos que usam como base os fungos entomopatogênicos e na última avaliação feita em 2007 eles representam 1-2% de todos os pesticidas vendidos em uma escala mundial (MARRONE, 2007).

2.3 Sistema Imune de Artrópodes

O sistema imune de invertebrados responde contra invasão de microorganismos de diversas formas como: as barreiras físico-químicas, sistema imune inato (MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009) e outras estratégias de defesa, que podem incluir a manutenção da imunidade da colônia por meio de alterações comportamentais. A maior parte do nosso conhecimento sobre sistema imune de artrópodes vem de estudos sobre insetos dípteros, por exemplo, *Drosophila melanogaster* e os mosquitos *Aedes* spp. e *Anopheles* spp., que são utilizados como modelo para elucidar os mecanismos de defesa frente o ataque dos patógenos (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; PAL; ST LEGER; WU, 2007; FOGAÇA et al., 2021).

A primeira linha de defesa é composta por barreiras físico-químicas que incluem a cutícula e o tecido epitelial do intestino e ovário (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). A cutícula é a primeira linha de defesa, considera-se que tem uma função ativa a partir da epiderme através da secreção de moléculas que agem especificamente inibindo os mecanismos de infecção dos entomopatógenos, através da produção de proteases, peptidases antifúngicas e inibidores de proteases fúngicas que podem desempenhar um papel importante durante a infecção, além da presença de ácidos graxos de cadeia curta e lipídios de cutícula que inibem a germinação de esporos fúngicos (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013). As complexas interações celulares e humorais ocorrem quando os patógenos superam essas barreiras (FEITOSA et al., 2015).

Além disso, há trabalhos que descrevem uma resposta imune conhecida como *priming immune*, que seria análoga à resposta de memória dos vertebrados, em insetos (RODRIGUES et al., 2010). Até o momento há apenas um relato relacionado a resposta de memória em carrapatos. Os autores mostraram que o priming imunológico conseguiu proteger *Ixodis scapularis* contra a infecção por *Anaplasma phagocytophilum* e *Dermacentor andersoni* contra a infecção por *Anaplasma marginale* (SHAW et al., 2017).

Devido a necessidade de uma resposta imune mais qualificada, os artrópodes possuem um sistema inato bem desenvolvido reagindo de forma rápida e geral (DE PAULO et al., 2018). A resposta imune inata é compreendida em sistema imune celular e humoral.

2.4 Sistema Imune Celular

A resposta celular consiste em uma resposta mediada por meio de hemócitos, essas células mediam os processos de fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento (STERBA et al., 2011; TAN et al., 2013).

Na hemolinfa, além de aminoácidos e hormônios, há os hemócitos (STERBA et al., 2011), são responsáveis por várias respostas imunológicas. São encontrados na hemolinfa e também em ligação com o corpo gorduroso, nefrócitos e glândulas salivares (FEITOSA et al., 2018; DE PAULO et al., 2018). O número de hemócitos circulantes varia de acordo com a espécie do invertebrado e principalmente com o momento fisiológico. Esta quantidade é influenciada pelo sexo, idade e o estágio de desenvolvimento (NATION et al., 2016) e também pode variar quando for desafiado por agentes patogênicos (DE PAULO et al., 2018). Silva et al., (2006), Freitas et al., (2015), Fiorotti et al., (2019a) relataram a variação na quantidade de hemócito durante a infecção fúngica denotando o papel imunossupressor e tóxico dos fungos entomopatogênicos.

Cinco tipos celulares distintos de hemócitos foram descritos em *R. microplus*: pró-hemócitos, plasmócitos, granulócitos, esferulócitos e oenocitóides (FIOROTTI et al., 2019b). O trabalho também mostrou que após a infecção fúngica, não foram visualizados pró-hemócitos e as populações de hemócitos mais observadas foram os granulócitos e plasmátócitos. As respostas imunes mais importantes dos hemócitos de artrópodes são fagocitose, encapsulação, nodulação (que envolve a melanização pela cascata de profenoloxidase - PPO), coagulação e produção de moléculas relacionadas ao sistema imunológico (FOGAÇA et al., 2021).

Os hemócitos podem fagocitar uma variedade de patógenos, incluindo, bactérias, leveduras, espiroquetas e partículas estranhas (PEREIRA et al. 2001; URBANOVA et al. 2015; 2017). Suas ações baseiam-se em englobamento e destruição intracelular dos patógenos invasores e envolve vários tipos de receptores de proteínas. Na maioria dos artrópodes, os plasmátócitos e os granulócitos são as principais células fagocíticas, que ao receberem sinais da presença do patógeno, migram rapidamente para o local da infecção e, eventualmente, fagocitam e destroem os invasores (FEITOSA et al., 2021). Em concentrações mais elevadas,

eles formam agregados chamados nódulos a fim de imobilizá-los e removê-los da circulação (STANLEY et al., 2009). Em contraste aos estudos sobre fagocitose, pesquisas sobre encapsulação e nodulação ainda são escassas, por isso pouco se sabe sobre os mecanismos de encapsulação e nodulação em carrapatos, existindo na literatura apenas estudos com *Dermacentor variabilis* (EGGENBERGER et al., 1990).

2.5 Sistema Imune Humoral

A resposta humoral inclui síntese de peptídeos antimicrobianos e atividade da fenoloxidase (PO). Essas respostas podem ser ativadas por vias importantes que estão envolvidas na ativação da resposta imune em artrópodes, sendo elas a via Toll, a via IMD, ativador de transcrição (JAK/STAT), por moléculas sinalizadoras como ROS e RNS (KOPACEK et al., 2010; FOGAÇA et al., 2021) e proteínas de reconhecimento. 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 JAK é semelhante a via de sinalização de citocinas em mamíferos (SHUAI, et al., 1993, LIU et al., 2011).

Insetos e crustáceos estão entre os invertebrados cujos hemócitos possuem reconhecidos componentes da resposta de melanização, mediada pela atividade da PO (CERENIUS; LEE; SODERHALL, 2008; BALI; KAUR, 2013). Esse processo pode ser ativado localmente por lesão da cutícula ou desencadeado sistemicamente por invasão microbiana da hemocele que resulta na deposição de melanina ao redor do tecido danificado ou do corpo estranho que ocorre durante o processo de encapsulamento (GILLESPIE et al., 2000; NAPOLITANO; DI DONATO; PROTA, 2000). Este processo complexo ocorre durante a ocorrência da melanogênese, em que a melanina é formada a partir do aminoácido fenilalanina, que é primeiro hidroxilado para fenilalanina hidroxilase por tirosina. A tirosina é então hidroxilada pela PO para produzir dopamina. A DA oxida-se então a dopaquinona a qual é imediatamente convertida a dopacromo por uma reação espontânea não enzimática (NAPPI; CHRISTENSEN, 2005). Na sequência ocorre um rearranjo não-enzimático estrutural de dopacromo, seguido pela descarboxilação, que produz 5-6 dihidroxi (DHI). O dihidroxi é oxidado pelo PO para formar 5-6 indolquinonas. Finalmente, são polimerizadas para eumelanina (NAPPI; CHRISTENSEN, 2005) que produz uma cor castanho-escuro ou enegrecido ajudando na pigmentação da cutícula, além do seu papel fundamental na resposta imune. Uma vez na hemolinfa, a PO livre (a proteinase ativadora de profenoloxidase (PAP) converte a PPO em PO) tende a se ligar a superfícies estranhas, como microrganismos

invasores, lesões teciduais, além das superfícies dos próprios hemócitos (LING; YU, 2005). Os compostos intermediários gerados no processo de melanização como semiquinonas, ROS e a própria melanina são tóxicos aos microrganismos (CERENIUS; et al., 2008).

A atividade da enzima fenoxidase é mais estudada em insetos, *Rhodnius prolixus* infectado com *Trypanosoma rangeli* (MELO et al. 1995), *Spodoptera litura* infectado com o fungo *B. bassiana* (BALI, KAUR, 2013) e em crustáceos, *Pacifastacus leniusculus* (LIU et al., 2007).

Pouco é conhecido sobre o sistema PPO-PO em aracnídeos. Zhioua et al. (1997) não detectaram atividade da PO nos carrapatos *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis* e *Ixodes scapularis*, sugerindo que poderia ser em decorrência de fatores inibitórios. Mais tarde, 21 anos depois, dois estudos relataram atividade semelhante à PO usando L-DOPA como substrato no carrapato *R. sanguineus* (FEITOSA et al., 2018) e no carrapato *Ornithodoros moubata* (KADOTA et al., 2002). No entanto, as enzimas responsáveis por tal atividade em carrapatos ainda não foram identificadas.

2.6 Monoamina Biogênica – Dopamina

As conexões entre os sistemas imunológico e nervoso são conhecidas em vertebrados e previnem a morte celular (FOGAÇA et al., 2021). O sistema imunológico responde de forma adaptativa a partir das informações que recebe sobre o ambiente, e o sistema nervoso reúne e integra as informações sensoriais e as envia para outros sistemas, incluindo o sistema imunológico (ADAMO, 2016). Atuando como ponte entre o sistema nervoso e os órgãos imunológicos estão as monoaminas biogênicas. Três aminas biogênicas são alvos de pesquisas sobre a modulação que exercem no sistema imune de vertebrados e invertebrados: dopamina (DA), octopamina (OA) e serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) (KONG et al., 2018).

Em insetos, um dos primeiros reconhecimentos da atuação da DA na ocorreu em 2008 por Sideri e colaboradores em hemócitos de *Ceratitis capitata* através de um silenciamento de um gene de codificação que converte a DOPA em DA ocorrendo o bloqueio da atividade de fagocitose. Neste trabalho não houve relatos da influência na quantidade de hemócitos circulantes. Genes para receptores de amina biogênica também foram expressos no sistema imunológico do grilo do Texas, *Gryllus texensis* (ADAMO, 2010). Wu et al. (2015) promoveram a inibição da síntese de DA com cloridrato de éster metílico de α -metil-DL-tirosina e o bloqueio do receptor DOP1 com o seu antagonista e observaram a diminuição da

atividade fagocítica dos hemócitos de *Chilo suppressalis*. Além disso, os autores testaram a aplicação tópica de DA após o desafio com o fungo patogênico para insetos, *B. bassiana*. Em 2018, Kong e colaboradores compararam a atividade de profilaxia dependente da densidade em *M. separata* à modulação imunológica através da OA e DA através de modulação na contagem total de hemócitos e na atividade da PO nas larvas aglomeradas. Diante destes dados e outros estudos com insetos, os resultados sugerem que há ação das amins biogênicas e que provavelmente está ligada à função imunológica dos insetos, como funções fagocíticas, atividade da PO e do número de hemócitos circulantes (WU et al., 2015; KONG et al., 2018).

A DA é um neurotransmissor que elicia seus efeitos por meio da ativação de receptores de dopamina estimuladores ou inibidores, que por sua vez regulam a síntese de AMP cíclico (cAMP) pela enzima adenilil ciclase (EJENDAL et al., 2011; IVERSEN; IVERSEN, 2007). Em vertebrados, existem cinco receptores diferentes de DA, os receptores estimuladores do tipo D1 (D1 e D5) e os inibidores do tipo D2 (D2, D3 e D4) (Figura 1A), enquanto Mustard e colaboradores (2005) relataram dois receptores para os artrópodes, sendo um estimulatório e outro inibitório.

Wu et al. (2015) explicaram que os insetos expressam três classes distintas de receptores DA. Um é o grupo “DOP1”, mais intimamente relacionado aos receptores D1-like de vertebrados; eles ativam a adenilato ciclase para aumentar AMP cíclico (cAMP), os segundo são os receptores D, que aumentam os níveis de cAMP intracelular e acoplam-se com a resposta de Ca^{2+} intracelular e o terceiro grupo, os receptores de invertebrados semelhantes a D2, que diminuem no níveis cAMP intracelular (Figura 1B). Os hemócitos expressam constitutivamente um receptor DA da membrana plasmática, CsDOP1, indicando que podem responder ao DA liberado por eles próprios ou pelos hemócitos vizinhos.

Estudos feitos por Ejendal e colaboradores (2012) exploraram os receptores de DA em glândula salivar de *I. scapularis*. O estudo foi feito através de um ensaio de triagem para antagonistas do receptor de DA a fim de obter mais informações dos dois receptores de dopamina tipo D1-like (Isdop1 e Isdop2) (Figura 1C). Da mesma forma, por meio de trabalho com *Aedes aegypti* também foi possível identificar antagonistas do receptor de dopamina através de uma triagem de biblioteca química. Os antagonistas dos receptores exibiram toxicidade para larvas de mosquito de uma maneira dependente da concentração (MEYER et al., 2012). Este trabalho é o primeiro registro de triagem de biblioteca química para antagonistas de um carrapato GPCR a fim de viabilizar novas opções químicas para serem exploradas em pesquisas futuras de descoberta de acaricidas.

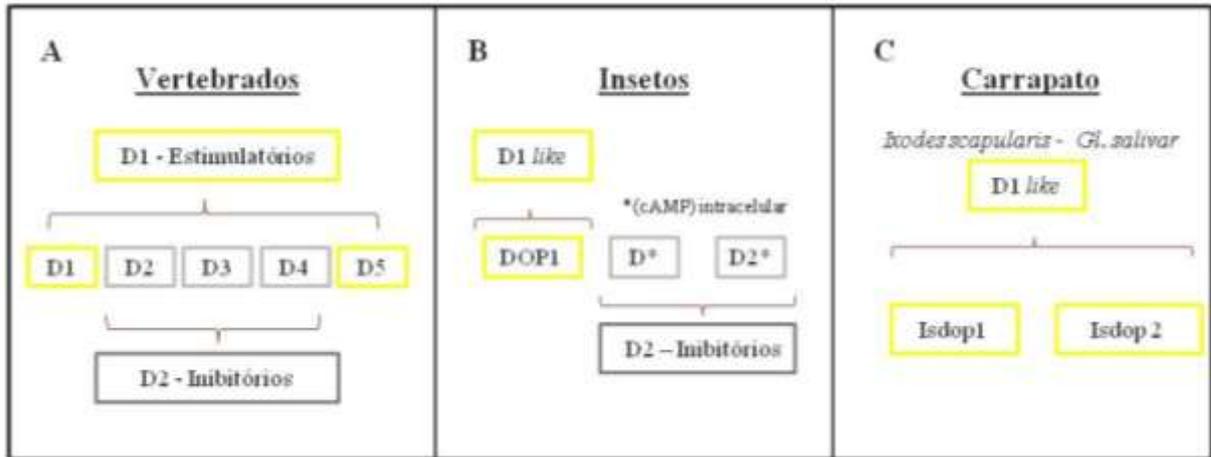


Figura 1: Esquema de receptores estimulatórios e inibitórios de dopamina (DA). (A) Receptores de DA em vertebrados (B) Receptores de DA em insetos que regulam o AMP cíclico intracelular (C) Receptores de dopamina em glândula salivar de *Ixodes scapularis*.

Em carrapatos, além dos estudos feitos por Ejendal et al. (2012), estudos anteriores de Kim e colaboradores (2011), identificaram o receptor D1 do carrapato ativado pela dopamina, como um potente indutor do processo dinâmico que envolve a secreção salivar dos carrapatos. Através de imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa foi possível analisar que a dopamina produzida nas células basais dos ácinos da glândula salivar é secretada no lúmen e ativa os receptores D1 na superfície luminal das células que revestem os ácinos. Os autores sugeriram uma função parácrina da dopamina que é mediada pelo receptor D1 na glândula salivar em uma fase inicial da alimentação. Já na fase final, ocorreram aumento e mudanças nos padrões de coloração do receptor D1. Demonstrando dessa forma que a dopamina tem papéis dinâmicos no sistema neuronal durante as fases de alimentação do carrapato (BOWMAN; SAUER, 2004; SIMO et al., 2011). Apesar desse estudo, ainda temos lacunas a serem preenchidas a respeito da compreensão das funções da DA na fisiologia do carrapato.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização e Realização dos Experimentos

Os experimentos foram realizados no período de março/2019 a junho/2021 nas instalações do 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;

3.2 Obtenção de *Rhipicephalus microplus*

Os carrapatos utilizados no presente estudo foram obtidos artificialmente [CEUA / Instituto Veterinário, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) - protocolo nº 9714220419]. As fêmeas de *R. microplus* totalmente ingurgitadas foram coletadas do chão de baias, lavadas em água corrente e imersas em solução de hipoclorito de sódio 0,05% por três minutos, depois secas e identificadas para serem utilizadas nos ensaios.

3.3 Fungo Entomopatogênico

Metarhizium anisopliae LCM S04 (MESQUITA et al., 2020) foi cultivado em meio de aveia sob condições controladas [25 ± 1 ° C; umidade relativa (UR) $\geq 80\%$] por 14 dias. Para a produção de blastosporos, 3 mL de suspensões aquosas de $1,0 \times 10^8$ conídeos/mL foram inoculados em 42 mL de meio de Adamek e incubados a 25 ° C por 72h. Os propágulos foram lavados com solução de água destilada estéril Tween® 80 0,01% (vol / vol) de acordo com o protocolo adaptado descrito por Bitencourt et al. (2020). As culturas foram incubadas a 25 ° C e os propágulos foram lavados com solução de água destilada estéril Tween® 80 a 0,01% (vol/vol). Os blastosporos foram quantificados e ajustados para $1,0 \times 10^6$ blastosporos/mL. Antes dos bioensaios, 10 μ L de suspensões aquosas de blastosporos foram transferidos para placas contendo ágar batata dextrose (BDA) e incubados a 25 ± 1 ° C e UR $\geq 80\%$ para avaliar a viabilidade do fungo (ALVES, 1998). A germinação dos propágulos foi determinada 24h após a incubação. Como o presente estudo acessou o patrimônio genético brasileiro, a pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen) sob o código AA47CB6.

3.4 Efeito da Dopamina na Sobrevivência de Carrapatos Tratados com *M. anisopliae*

Fêmeas de *R. microplus* completamente ingurgitadas foram divididas em cinco grupos homogêneos com 15 carrapatos cada: C (grupo não tratado), P (carrapatos inoculados com 3µL solução tampão de fosfato), D (carrapatos inoculados com 3µL de 1.025 ng/µL DA (Sigma-Aldrich®) (WU et al., 2015), M [carrapatos inoculados com *M. anisopliae* (3µL; 10⁶ blastosporos/mL)], e DM [carrapatos inoculados com DA (3µL; 1.025 ng/µL) e após 20 minutos, *M. anisopliae* (3µL; 10⁶ blastosporos/mL)]. Após a inoculação, entre o capítulo e o escudo dorsal (ANGELO et al., 2010), as fêmeas foram incubadas a 27 ± 1 ° C e UR ≥ 80%. A mortalidade das fêmeas foi analisada 24h, 48h e 72h após a inoculação. O experimento foi repetido duas vezes.

3.5 Quantificação de Hemócitos após Infecção por *M. anisopliae*

Fêmeas de *R. microplus* totalmente ingurgitadas foram divididas em grupos homogêneos de 60 carrapatos cada. Os grupos foram C, P, D, M e DM. Os carrapatos foram inoculados conforme descrito no item 3.4. A coleta da hemolinfa foi realizada 24h após o tratamento de acordo com De Paulo et al. (2018). Os hemócitos foram quantificados em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico. O experimento foi realizado em triplicata e repetido duas vezes.

3.6 Ensaio Fagocítico in vitro

O índice fagocítico foi calculado com base nos hemócitos coletados de fêmeas submetidas a diferentes tratamentos e posteriormente expostas a *M. anisopliae* ou Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae*) (Sigma-Aldrich®). Grupos homogêneos pesados com 30 carrapatos cada foram inoculados com DA (3 µL; 1.025 ng/µL DA) ou PBS (3 µL) (P), os carrapatos no grupo controle (C) não tiveram tratamento/inoculação. A inoculação foi realizada de acordo com De Paulo et al. (2018) e após 24h da inoculação, a hemolinfa foi coletada (ANGELO et al., 2010) em 500 µL de meio L-15 Leibovitz Gibco®. O ensaio de fagocitose seguiu o protocolo estabelecido por KUKLINSKI et al. (2010). Os hemócitos foram quantificados em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico. Um total de 2 × 10⁴ células foram alocadas em lamínulas circulares e colocadas em uma placa de cultura de 24 poços (Kasvi®). As placas foram incubadas a 32 ° C durante 10 min para formação de monocamada de hemócitos. Blastosporos de *M. anisopliae* (20µL; 10⁶

blastosporos/mL) ou Zymosan A (20 μ L; 10⁶ leveduras/mL) foram incubados com os hemócitos, e o volume final (250 μ L) ajustado com meio L-15 Leibovitz Gibco[®]. As placas foram incubadas a 32 °C durante duas horas. As células foram fixadas com metanol (Sigma-Aldrich[®]) por três minutos e coradas com Giemsa Sigma-Aldrich[®] (BRAYNER et al., 2005). Hemócitos com propágulos fúngicos internalizados foram contados usando um microscópio óptico. O número de hemócitos que realizaram a fagocitose foi obtido pela contagem de 100 hemócitos, em pelo menos seis lâminas. Todo o experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes.

3.7 Atividade Fenoloxidase na Hemolinfa de *R. microplus* Inoculados com *M. anisopliae*

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram divididas em grupos com 27 carrapatos distribuídos em grupos de peso homogêneo: C, P, D, M e DM. As fêmeas foram inoculadas entre o capítulo e o escudo dorsal com auxílio de um microscópico estereoscópico e microinjetor Drummond[®], seguindo a dose e metodologia descrita no item 3.4. Alíquotas de dois μ L de hemolinfa foram coletadas (ANGELO et al., 2010) de cada carrapato 24h, 48h e 72h após a inoculação do fungo e incubadas por 10 min com 28 μ L de tampão cacodilato 0,01 M com 0,5 mM de CaCl₂ pH 7,0, em placas de 96 poços de fundo plano (Kasvi[®]). Dez microlitros de solução saturada de L-DOPA (Sigma-Aldrich, EUA) a quatro mg/mL foram adicionados à mistura por 20 min em temperatura ambiente. A absorbância foi medida num leitor de placas ELISA (Thermo Fisher[®]) a 490 nm. O tampão cacodilato na mesma concentração do utilizado na incubação com as amostras, foi usado como a solução em branco de acordo com FEITOSA et al. (2018). O experimento foi repetido duas vezes e as amostras foram lidas em triplicata.

3.8 Detecção de Dopamina em Hemócitos de *R. microplus* Tratados com *M. anisopliae*

Quatro grupos experimentais com 25 carrapatos cada foram avaliados: C, D, M e DM. As fêmeas foram inoculadas como descrito no item 3.4. Vinte quatro horas após o tratamento, a hemolinfa foi coletada (ANGELO et al., 2010) em 500 μ L de meio L-15 Leibovitz Gibco[®]. Os hemócitos foram quantificados em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópico óptico e a concentração foi ajustada para 2 \times 10⁴ células em cada lamínula circular e colocados em placa de cultura de 24 poços (Kasvi[®]). Os hemócitos foram fixados com paraformaldeído 4% por 30 min e lavados em PBS três vezes. Os hemócitos foram incubados com anticorpo primário anti-dopamina (ab6427; Abcam, Cambridge, Reino Unido) por 72h,

seguido pelo anticorpo secundário [Goat anti-rabbit Alexa Fluor 594 (vermelho)] durante uma hora à temperatura ambiente. Os núcleos dos hemócitos foram corados com DAPI (azul) em temperatura ambiente. As imagens dos hemócitos marcados para dopamina foram obtidas com auxílio do microscópio de fluorescência BX 51 (Olympus[®]) de acordo com o protocolo adaptado descrito por WU et al. (2015). O experimento foi realizado duas vezes.

3.9 Análise Estatística

Exceto para as análises de sobrevivência, os dados foram verificados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados de atividade de PO foram transformados em raiz quadrada antes da análise para melhor atender aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância. A quantificação dos hemócitos foi analisada por one-way ANOVA seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$), o índice fagocítico foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ($P < 0,05$) e a atividade PO foi analisada por two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A sobrevivência do carrapato foi analisada usando o teste Log-rank. Todos os dados foram analisados por meio do GraphPad Prism versão 8.4.2 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da Dopamina na Sobrevivência de Carrapatos Tratados com *M. anisopliae*

O grupo controle, carrapatos não tratados (C) e os carrapatos tratados com PBS (P) ou DA (D) tiveram 100% de sobrevivência. Para determinar a mortalidade das fêmeas os carrapatos foram analisados quanto aos aspectos e foi verificado se realizavam algum tipo de movimentação. A sobrevivência do carrapato no grupo inoculado exclusivamente com o fungo (M) atingiu $17 \pm 7\%$ de sobrevivência 72h após a inoculação, enquanto os carrapatos inoculados com DA e *M. anisopliae* (DM) exibiram $67 \pm 13\%$ de sobrevivência 72h após a inoculação (Figura 2).

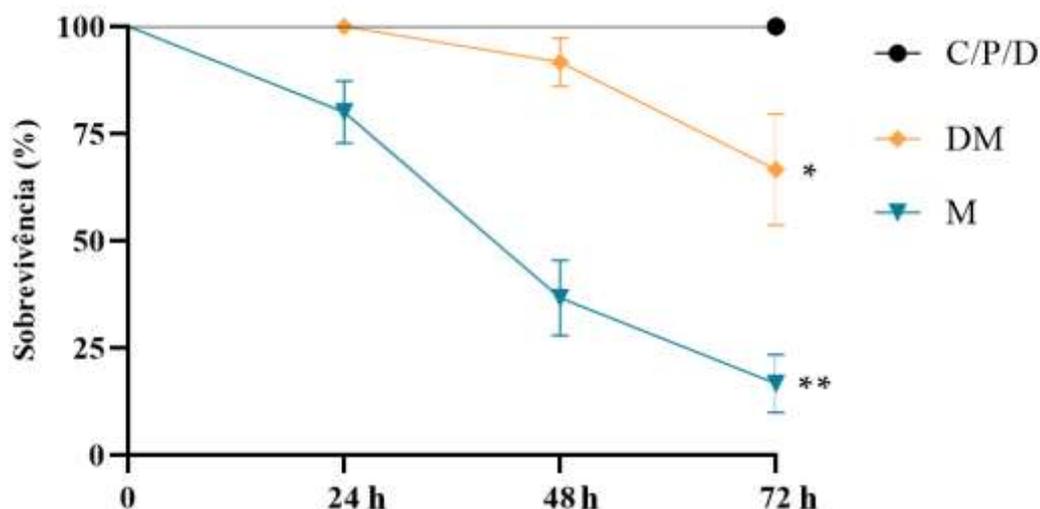


Figura 2: Efeito da dopamina na sobrevivência de *Rhipicephalus microplus* inoculados com *Metarhizium anisopliae*. Porcentagem da média de sobrevivência e o erro padrão de fêmeas de *R. microplus* inoculadas com blastosporos de *M. anisopliae* (10^6 blastosporos/mL) e com dopamina ($1.025 \text{ ng}/\mu\text{L}$) de acordo com o Log-rank ($P < 0,0001$). Experimento representativo de duas repetições independentes, onde (*) representa a diferença estatística entre o grupo DM e os grupos de controle ($P = 0,0012$) e (**) a diferença entre o grupo M e os grupos de controle ($P < 0,0001$). C: carrapatos não tratados; P: carrapatos inoculados com solução tampão de fosfato; D: carrapatos inoculados com dopamina; M: carrapatos inoculados com *M. anisopliae*; DM: carrapatos inoculados com dopamina e o fungo.

4.2 Quantificação de Hemócitos após Infecção por *M. anisopliae*

Carrapatos não tratados (C) e carrapatos inoculados com PBS (P) exibiram $1,6 \pm 0,1 \times 10^6$ e $1,6 \pm 0,2 \times 10^6$ hemócitos/mL na hemolinfa, respectivamente, 24 h após a inoculação. A

inoculação com blastosporos de *M. anisopliae* (M) não reduziu o número de hemócitos em comparação com carrapatos não tratados (C). No entanto, a inoculação de DA, seguida ou não do fungo entomopatogênico (ou seja, D ou DM) aumentou o número de hemócitos em comparação ao grupo controle (P = 0,003 e P < 0,0001 respectivamente) (Figura 3).

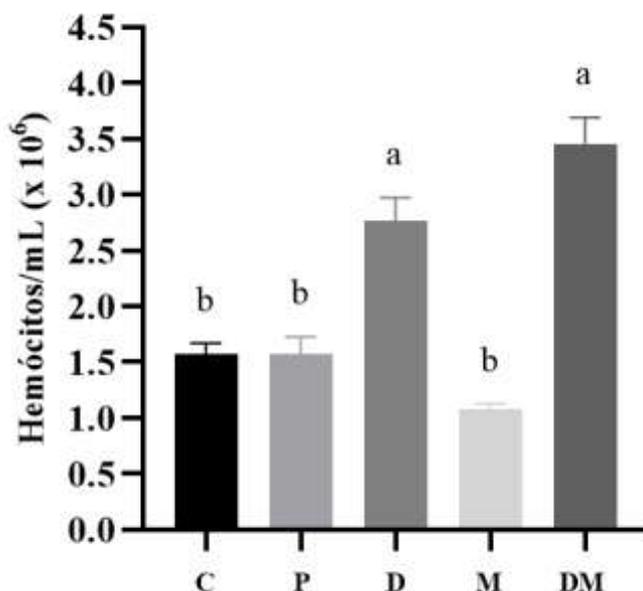


Figura 3: Contagem de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* após inoculação de dopamina e *Metarhizium anisopliae*. Número médio e erro padrão de hemócitos/mL de hemolinfa de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* 24h após inoculação com blastosporos de *M. anisopliae* (10⁶ blastosporos/mL) e com dopamina (1.025 ng/μL). Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey (P < 0,05). Experimento representativo de duas repetições independentes, totalizado n de 120 carrapatos. **C:** carrapatos não tratados; **P:** carrapatos inoculados com solução tampão de fosfato; **D:** carrapatos inoculados com dopamina; **M:** carrapatos inoculados com *M. anisopliae*; **DM:** carrapatos inoculados com dopamina e o fungo.

4.3 Ensaio Fagocítico *in vitro*

O índice fagocítico foi determinado duas horas após a incubação como uma razão de hemócitos fagocíticos e não fagocíticos com blastosporos de *M. anisopliae* ou *S. cerevisiae* (Zymozan A[®]) variou de 24 ± 0,8% (P *M. anisopliae*) a 29 ± 1,4% (D *M. anisopliae*) duas horas após a incubação. Os índices fagocíticos foram estatisticamente semelhantes para todos os grupos testados (F_{5,12} = 5; P = 0,101) (Figura 4).

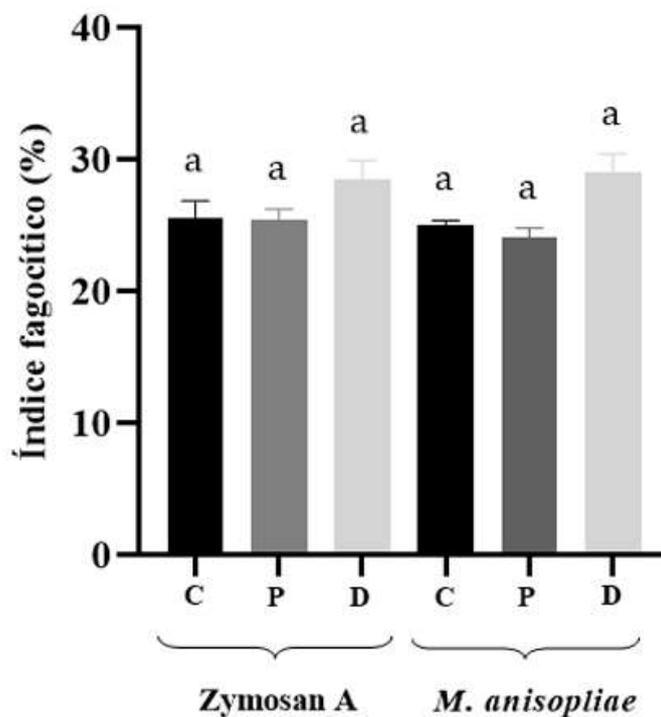


Figura 4: Índice fagocítico de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* após incubação com blastosporos de *Metarhizium anisopliae* ou *Saccharomyces cerevisiae* (Zymozan A[®]). Os hemócitos foram coletados de fêmeas de carrapatos não tratadas (C), carrapatos previamente inoculados com tampão fosfato (P) ou (D) dopamine (1.025 ng/μL). Os dados foram apresentados em média e erro padrão. O índice fagocítico foi determinado com o número de hemócitos exibindo fagocitose por 100 hemócitos representativos de três repetições independentes e triplicate, totalizando 90 carrapatos. Barras seguidas da mesma letra não difrem estatisticamente seguidos pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ($P < 0,05$).

4.4 Atividade Fenoloxidase na Hemolinfa de *R. microplus* inoculados com *M. anisopliae*

A atividade PO na hemolinfa de fêmeas totalmente ingurgitadas de *R. microplus* foi avaliada 24h, 48h e 72h após a inoculação de DA exógena e *M. anisopliae*. As análises estatísticas compararam diferentes tratamentos ao mesmo tempo (24 h, 48 h ou 72 h). Todos os grupos (C, P, D, M e DM) exibiram atividade PO semelhante 24 h após a inoculação ($P > 0,05$) (ou seja, C = $0,052 \pm 0,007$ U; P = $0,045 \pm 0,010$ U; D = $0,056 \pm 0,007$ U; M = $0,034 \pm 0,002$; DM = $0,033 \pm 0,003$ U). 48 h após a inoculação, a maior atividade PO ($0,057 \pm 0,010$ U) foi observada na hemolinfa de carrapatos inoculados com PBS (P). Sua atividade foi estatisticamente semelhante a C ($0,043 \pm 0,006$ U), D ($0,044 \pm 0,007$ U) e DM ($0,049 \pm 0,004$ U), mas diferente de carrapatos inoculados com *M. anisopliae* ($0,029 \pm 0,002$ U) ($P = 0,037$).

(Figura 5A). 72 h após a inoculação, a atividade PO de carrapatos inoculados com DA exógena e *M. anisopliae* (DM) ($0,041 \pm 0,019$ U) foi maior do que a atividade exibida pelo grupo controle (C) ($0,009 \pm 0,002$ U) ($P = 0,001$) e o grupo inoculado exclusivamente com *M. anisopliae* (M) ($0,012 \pm 0,002$ U) ($P = 0,001$) (Figura 5B). O mesmo foi observado para o grupo inoculado exclusivamente com DA exógena (D) ($0,032 \pm 0,006$ U) em comparação com (C) ($P = 0,002$) e (M) ($P = 0,035$) (Figura 5B).

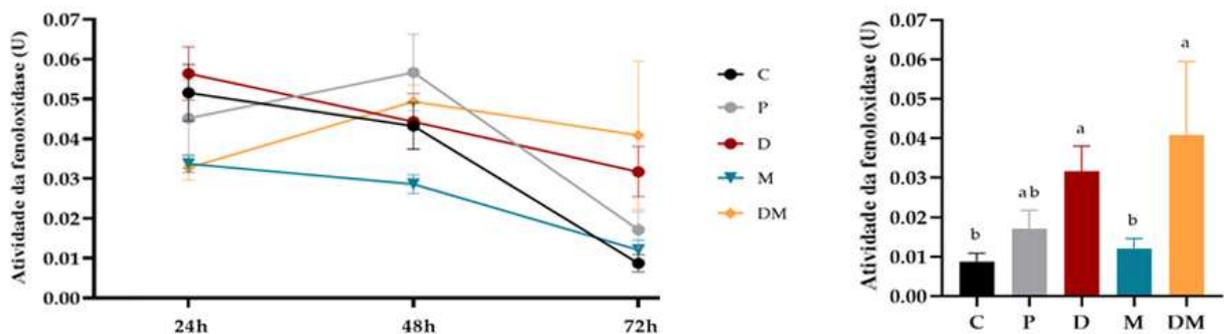


Figura 5: Atividade da fenoloxidase (U) na hemolinfa de *Rhipicephalus microplus* em diferentes tempos de inoculação de dopamina e *Metarhizium anisopliae*. Os dados foram representados como média e erro padrão de atividade de fenoloxidase de hemolinfa de carrapatos 24, 48 e 72h após inoculação com blastosporos de *M. anisopliae* (10^6 blastosporos/mL) e com dopamina (1.025 ng/ μ L). Dados representativos de duas repetições independentes e triplicata, totalizado n de 54 carrapatos. Barras com a mesma letra não diferiram estatisticamente após two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). **C:** carrapatos não tratados; **P:** carrapatos inoculados com solução tampão de fosfato; **D:** carrapatos inoculados com dopamine (1.025 ng/mL); **M:** carrapatos inoculados com *M. anisopliae* (10^6 blastosporos/mL); **DM:** carrapatos inoculados com dopamina e o fungo.

4.5 Detecção de dopamina em hemócitos de *R. microplus* tratados com *M. anisopliae*

Os hemócitos de *Rhipicephalus microplus* foram imunomarcados com anticorpo contra dopamina e um anticorpo secundário (Alexa Fluor 594; vermelho) e seus núcleos foram contrastados com DAPI (azul). Como resultado, a figura 6 mostra os grânulos DA marcados (vermelho) no citosol dos hemócitos, permitindo uma análise da presença de dopamina nas células. Os hemócitos de todos os grupos (incluindo carrapatos não tratados) exibiram marcados com DA. Os hemócitos de carrapatos inoculados exclusivamente com DA exibiram marcação aparentemente mais evidente (Figura 6B).

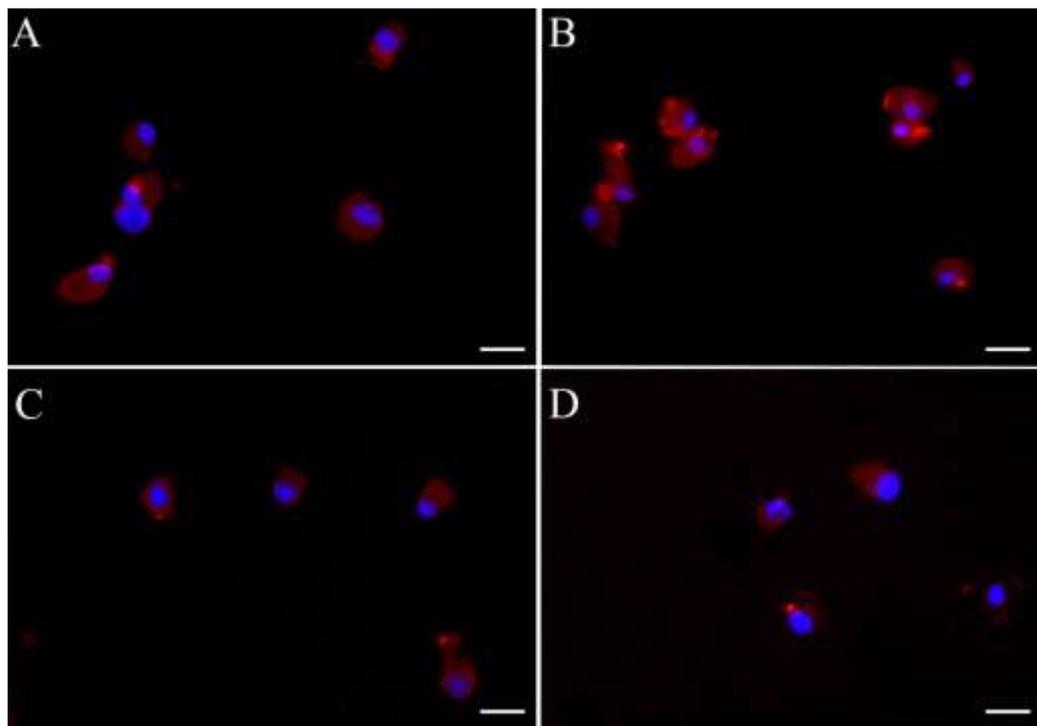


Figura 6: Presença de dopamina nos hemócitos de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus microplus* após 24h de inoculação de dopamina e *Metarhizium anisopliae*. A dopamina foi visualizada em microscópio de fluorescência BX 51 (Olympus[®]) nos hemócitos (Alexa Fluor 594; vermelho). Os núcleos foram contrastados com DAPI (azul). (A) carrapatos não tratados (CTR); (B) carrapatos inoculados com dopamina (DA); (C) carrapatos inoculados com blastosporos de *Metarhizium anisopliae* (Ma); (D) carrapatos inoculados com dopamina e blastosporos de *M. anisopliae* (DA+Ma). A barra de escala representa 10 μm. Foram analisados hemócitos da hemolinfa de 25 carrapatos em cada tratamento. Barra de escala= 10 μm.

5 DISCUSSÃO

Fungos entomopatogênicos foram os primeiros agentes aplicados no controle microbiano de insetos (MAINA et al., 2018). Normalmente, os fungos entomopatogênicos agem infectando seus alvos por meio de esporos especializados (conídios) que se fixam, germinam e penetram na cutícula do hospedeiro artrópode. Uma vez infectado, o patógeno pode desafiar a imunidade humoral e celular do artrópode. Monoaminas biogênicas, como DA, são considerados o principal elo entre os sistemas nervoso e imunológico em insetos. Apesar disso, até onde sabemos, não existem estudos sobre a ação da dopamina no sistema imunológico de carrapatos desafiados com entomopatógenos.

No presente estudo, foi avaliado o efeito da dopamina na sobrevivência de *R. microplus* inoculado por *M. anisopliae*. O isolado fúngico utilizado neste estudo é considerado virulento para carrapatos *R. microplus* (MESQUITA et al, 2020). Os blastosporos são células vegetativas semelhantes a leveduras produzidas *in vitro* e não idênticas, mas análogas às produzidas na hemocele do hospedeiro durante a infecção fúngica (BERNARDO et al., 2020). Com base em nossos resultados, a DA exógena aumentou quase quatro vezes a sobrevivência de *R. microplus* ao fungo 72h após o tratamento (Figura 2). Resultados semelhantes foram relatados em um estudo com *C. suppressalis* (Crambidae: Lepidoptera), onde as larvas foram inoculadas com DA e imersas em suspensão de *B. bassiana* (WU et al., 2015). Seus resultados mostraram que a DA aumentou 1,2 vezes a sobrevivência larval cinco a 10 dias após o tratamento com o fungo. WU e colaboradores (2015) sugeriram que, em insetos, a DA pode atuar em um mecanismo autócrino, ou talvez parácrino, para potencializar as reações de defesa celular à infecção.

Em relação à resposta celular, o número de hemócitos circulantes nos artrópodes pode variar de acordo com a ativação do sistema imunológico. Em carrapatos, o número de hemócitos circulantes na hemolinfa aumenta com uma infecção fúngica (DE PAULO et al., 2018). No presente estudo, a infecção por *M. anisopliae* com blastosporos não reduziu a concentração de hemócitos. Isso pode ser devido ao número e tipo de propágulos de *Metarhizium* usados por esses autores. O número de propágulos inoculados em seu estudo foi quase 17 vezes maior (ou seja, 5×10^7 conídios) do que no presente estudo (3×10^6 blastosporos). De acordo com nossos resultados, a inoculação de DA exógena, seguida ou não da inoculação do fungo, aumentou o número de hemócitos circulantes 24h após a inoculação. Isso sugere que DA desempenha um papel importante na resposta imune celular de carrapatos *R. microplus*. Por outro lado, em outros invertebrados, o tratamento com DA reduziu ou não

afetou o número de hemócitos circulantes (KONG et al., 2018; CHANG et al., 2007). Esse contraste pode estar relacionado a diferenças fisiológicas entre esses organismos, dose de DA e tempo de análise após o tratamento.

Os hemócitos de artrópodes atuam na fagocitose, encapsulação, nodulação, melanização, coagulação e produção de moléculas relacionadas ao sistema imunológico (FOGAÇA et al., 2021). A ação fagocítica dos hemócitos contra bactérias, fungos e outras partículas estranhas desempenha um papel significativo na resposta imunológica dos carrapatos após a infecção (LOOSOVÁ; JINDRÁK; KOPÁČEK, 2001, PEREIRA et al., 2001; BURESOVA et al., 2009; URBANOVÁ et al., 2014; 2017; FEITOSA et al., 2018). A inibição da síntese de DA em hemócitos de inseto prejudicou sua fagocitose e a incubação de DA exógena com hemócitos aumentou a sua fagocitose (WU et al., 2015). Esses autores apoiaram a hipótese de que DA é responsável por mediar a fagocitose por hemócitos de insetos. No presente estudo, apesar de a DA exógena ser sugerida por contribuir para a sobrevivência dos carrapatos e aumentar o número hemolinfático de hemócitos, seu índice fagocítico não foi estimulado pela inoculação prévia da DA exógena (Figura 4).

Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro relato de atividade PO na hemolinfa de *R. microplus*. Aqui, inesperadamente, a atividade PO de fêmeas inoculadas com *M. anisopliae* foi estatisticamente semelhante a carrapatos não tratados 72h após a inoculação (Figura 5B), sugerindo que o fungo entomopatogênico não desencadeou uma resposta imune relacionada à atividade PO que teria aumentado seus níveis basais. Por outro lado, a inoculação de DA exógena (isolada ou seguida de inoculação de *M. anisopliae*) aumentou a atividade PO hemolinfática em *R. microplus* e também o número de hemócitos. PO é uma proteína presente na hemolinfa livre de células de invertebrados e, de acordo com a literatura, é ativada por clivagem proteolítica específica em resposta a feridas ou infecções patogênicas (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004). A atividade PO é amplamente estudada em insetos como *R. prolixus* (MELLO et al., 1995; CASTRO et al., 2012), *S. litura* (BALI; KAUR, 2013) e *Mythimna separata* (KONG et al., 2018), e está envolvida com melanização, fagocitose e nodulação de patógenos (CERENIUS et al., 2008). Em aracnídeos, sua atividade foi detectada em *Polybetes pythagoricus* (Sparassidae: Araneae) (LAINO et al., 2015), *Ornithodoros moubata* (Argasidae: Ixodida) (KADOTA et al., 2002) e *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae: Ixodida) (FEITOSA et al., 2018). Feitosa et al., (2018) relataram um aumento da atividade PO na hemolinfa de carrapatos infectados por *Leishmania infantum* (Trypanosomatidae: Trypanosomatida) 5 dias após a inoculação, mas não 24h ou 48h após a infecção. O aumento da atividade PO tem sido

associado à lise dos hemócitos por serem a fonte da profenoloxidase (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004; FEITOSA et al., 2018). Apesar disso, os resultados do presente estudo sugeriram que o aumento da atividade PO em inoculado com DA não está necessariamente ligado à ruptura dos hemócitos.

No presente estudo, as análises de microscopia de fluorescência detectaram a presença de dopamina nos hemócitos de carrapatos *R. microplus* mesmo em condições fisiológicas, sugerindo que essas células podem produzir DA naturalmente. Em outro estudo recente, a imunohistoquímica DA revelou grânulos imunorreativos nas células basais dos ácinos na glândula salivar apenas durante a fase inicial de alimentação, de 24 a 48 horas após o início da alimentação, em uma espécie diferente de carrapato duro, *I. scapularis* (SIMO et al, 2011). Este é o primeiro relato de detecção de DA em hemócitos de carrapatos. Este resultado suporta os achados de WU et al. (2015) que também detectaram DA em hemócitos de *C. suppressalis*. Seu estudo relatou a capacidade dos hemócitos de insetos de expressar constitutivamente um receptor DA em sua membrana plasmática, indicando que os hemócitos estão equipados individualmente para responder ao DA liberado por eles próprios ou por hemócitos vizinhos. Nosso estudo demonstrou pela primeira vez a modulação da DA exógena na resposta imune celular e na sobrevivência de *R. microplus* inoculado com *M. anisopliae*. A análise da resposta imune de *R. microplus* desafiada com fungos entomopatogênicos contribui para o avanço do conhecimento da integração do fungo com os carrapatos e pode colaborar com o desenvolvimento de novas estratégias eficazes de controle biológico.

6 CONCLUSÕES

Pela primeira vez foi demonstrado o papel da dopamina no centro germinativo: a sua ação constitui uma vantagem na diferenciação dos linfócitos B nas células que produzem os anticorpos e, potencialmente este mecanismo pode ser modulado no decurso de uma doença. As avaliações do presente estudo corroboraram com as hipóteses iniciais do trabalho, exceto pela modificação da atividade fagocítica dos hemócitos. Sendo assim foi possível concluir que a inoculação com DA exógena:

- Reduz a suscetibilidade de *R. microplus* à infecção por *M. anisopliae* 72 horas após a inoculação;
- Pode influenciar o número de hemócitos circulantes de *R. microplus*;
- Não alterou o índice fagocítico de *R. microplus* nos hemócitos desafiados com *M. anisopliae*;
- Influenciou a atividade da fenoloxidase na hemolinfa de carrapatos inoculados com DA e o fungo ou exclusivamente com DA 72h após o tratamento;
- Através da microscopia de fluorescência foi possível detectar a presença de dopamina nos hemócitos de carrapatos *R. microplus* mesmo em condições fisiológicas;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMO, S. A. Stress response sculpt the insect immune system, optimizing defense in an ever-changing world. **Developmental & Comparative Immunology**, p.1–9, 2016.
- ADAMO, S.A. Why should an immune response activate the stress response? Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). **Brain Behaviour Immunology**., v.24, p.194–200, 2010.
- ALVES, R. T.; FARIA, M. Pequeno Manual sobre fungos entomopatogênicos. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, 50p, 2010.
- ANGELO, I.C.; GOLO, P.S; CAMARGO, M.G.; KLUCK, G.E. G.; FOLLY, E. ; BITTENCOURT, V.R.E.P. Haemolymph Protein and Lipid Profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Infected by Fungi. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 79-83, 2010.
- BALI, G.K; KAUR, S. Phenoloxidase activity in haemolymph of *Spodoptera litura* (Fabricius) mediating immune responses challenge with entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **J Entomology and Zoology Studies**,v.1, p.118-123, 2013.
- BANUMATHI, B.; VASEEHARAN, B.; RAJASEKAR, P.; PRABHU, N.M.; RAMASAMY, P.; MURUGAN, K.; CANALE, A.; BENELLI, G. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – A review. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p.102-110, 2017.
- BERNARDO, C.C; BARRETO, LP, SILVA, C; LUZ C; ARRUDA, W; FERNANDES, ÉKK. Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 9(5), p.1334–42, 2018.
- BERNARDO, C.C; PEREIRA-JUNIOR, R.A; LUZ, C; MASCARIN, G.M; FERNANDES, É.K.K. Differential susceptibility of blastospores and aerial conidia of entomopathogenic fungi to heat and UV-B stresses. **Fungal Biology**, v.124(8), p.714-722, 2020.
- BITENCOURT, R.O.B; MALLETT, J.R;S; MESQUITA, E; GÔLO, P.S; FIOROTTI, J; BITTENCOURT, V.R.E.P, et al. Larvicidal activity, route of interaction and ultrastructural changes in *Aedes aegypti* exposed to entomopathogenic fungi. **Acta Tropical**, v.213. 2021.
- BOWMAN, A.S., SAUER, J.R. Tick salivary glands: function, physiology and future. **Parasitology**. v.129,p.67- 81, 2004.
- Brasília, DF: **Embrapa** Informação Tecnológica, 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias>>.
- BRAYNER, F.A; ARAÚJO, H.R.C; CAVALCANTI, M.G.S; ALVES, L.C; PEIXOTO, C.A. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Micron**, v.36(4), p.359–67, 2005
- BURESOVA, V; HAJDUSEK, O; FRANTA, Z; SOJKA, D; KOPACEK, P. IrAM-An alpha2-macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus*: characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen *Chryseobacterium indologenes*. **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, p.89–498, 2009.
- CAMARGO, M.G; MARCIANO, A.F; SÁ, F.A; PERINOTTO, W.M.S; QUINELATO. S; GÔLO, P.S, et al. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Vet Parasitology**., v.205(1–2), p.271–6, 2014.

- 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. **Vet Parasitology**, v.223, p.38–42, 2016.
- CARVALHO, R.S. Biocontrole de moscas-das-frutas: histórico, conceitos e estratégias. **Circular técnica 83 da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, Cruz das Almas, dez., 2006.
- CERENIUS, L; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev.* **2004**, *198*, 116-126, doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x.
- CERENIUS, L; LEE, B.L; SÖDERHÄLL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in Immunology**, v.29(6), p.263–271, 2008.
- CHANDLER, D; DAVIDSON, G; PELL, J.K; BALL, B.V; SHAW, K; SUNDERLAND, K.D.; Fungal biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology** 10, 357–384, 2000.
- CHANG, C.C; WU, Z.R; KUO, C.M; CHENG, W. Dopamine depresses immunity in the tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunology**, v.23(1), p.24–33, 2007.
- DA 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.
- DALZOTO, P. R.; UHRY, K. F. Controle biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Biológico**, v.71, p.37-41, 2009.
- DE FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v.43, p.237-256, 2007.
- DE PAULO, J.F; CAMARGO, M.G; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B ; MARCIANO, A.F; DE FREITAS, M.C; DA SILVA, E.M ; GÔLO, P.G; MORENA, D.D.S ; DA COSTA ANGELO, I; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Rhipicephalus microplus* infected by *Metarhizium*: unveiling hemocyte quantification, GFP-fungi virulence, and ovary infection. **Parasitology Research**, v. 117, p.1847-1856, 2018.
- DEVOTTO, L.M.; GERDING, A.; FRANCE, A. Hongos entomopatogênicos: uma alternativa para a obtenção de biopesticidas. **Bioleche**, v. 23, p. 30-33, 2000.
- EGGENBERGER, L.R; LAMOREAUX, W.J; COONS, L.B. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. *Experimental and Applied Acarology*, v.9, p.279-287, 1990.
- EJENDAL, K.F.K; MEYER, J.M, BRUST, T.F, AVRAMOVA. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p..846-853, 2012
- FEITOSA, A.P.S; ALVES, L.C; CHAVES, M.M; VERAS, D.L; SILVA, E.M; ALLIANC, A.S.S; FRANC, I.R.S; GONC, G.G.GA; ALVES, FIMA-FILHO, J.L. Hemocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Journal Of Medical Entomology**, v. 52, n. 6, p.1193-1202, 2015.
- FEITOSA, A.P.S; CHAVES, M.M; VERAS, D.L; DE DEUS, D.M.V; PORTELA, N.C, ARAÚJO, A.R, ALVES, L.C; BRAYNER, F.A, Assessing the cellular and humoral immune response in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) infected with *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908), **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 6, p.1421-1430, 2018.

FERNANDES, É.K.K; BITTENCOURT, V.R.E.P; ROBERTS, D.W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v.130, p.300–305, 2012.

FERNÁNDEZ-SALAS, A; ALONSO-DÍAZ, M.A; ALONSO-MORALES, R.A; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J.C; CERVANTES-CHÁVEZ JA. Acaricidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolated from paddocks in the Mexican tropics against two populations of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.31(1), p.36–43, 2017.

FIOROTTI, J; GÔLO, P.S; MARCIANO, A.F; CAMARGO, M.G; ANGELO, I.C; BITTENCOURT, V.R.E.P. Disclosing hemolymph collection and inoculation of *Metarhizium* blastospores into *Rhipicephalus microplus* ticks towards invertebrate pathology studies. **Journal of Visualized Experiments**, v.148, p.1–7, 2019a.

FIOROTTI, J.; MENNA-BARRETO, R.F.S; GÔLO, P.S; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B; BITENCOURT, R.O.B; SPADACCI-MORENA, D. D; ANGELO, I.C; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ultrastructural and Cytotoxic Effects of *Metarhizium robertsii* Infection on *Rhipicephalus microplus* Hemocytes. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1-17, 2019b.

FINKLER, C.L.L.; Controle de insetos: Uma breve revisão. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v.8 e 9, p.169-189, 2011/2012.

FOGAÇA, A.C; SOUSA, G; PAVANELO, D.B; ESTEVES, E; MARTINS, L.A; URBANOVÁ, V, et al. Tick immune system: what is known, the interconnections, the gaps, and the challenges. **Frontiers in Immunology**., v.12, p.1–23, 2021.

FURLONG, J; PRATA, M.C.A. Conhecimento básico para controle do carrapato-dos-bovinos. In: FURLONG, J. (Org.). **Carrapatos: problemas e soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. p.9-20, 2005.

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

GILLESPIE, J.P; BAILEY, A.M; COBB. B; VILCINSKAS, A. Fungi as elicitors of insect immune responses. **Arch Insect Biochem Physiol.**, v.44(2), p.49–68, 2000.

GONZÁLES, J.C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Can. 1887) (Revisão histórica e conceitual). **A Hora Veterinária**, ano 21, p.23-28, 2002.

GOMEZ-PEREZ, M.L; ROMERO-GONZALEZ, R; PLAZA-BOLANO, P; GEÑIN, E; MARTÍNEZ VIDAL, J.L; GARRIDO, F.A. Wide- scope analysis of pesticide and veterinary drug residues in meat matrices by high resolution MS: detection and identification using Exactive-Orbitrap. **Journal of Mass Spectrometry**, v.49, p.27–36, 2014.

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

HESKETH, H; ROY, H. E; EILENBERG, J; PELL, J. K; HAILS, R.S. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. **BioControl**, v. 55, p. 55-73, 2010.

- HIGA, L.O.S.; GARCIA, M.V.; BARROS, J.C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview. **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 326-333, 2015.
- HU, G.; ST. LEGER, J. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6383-6387, 2002.
- HUMBER, R.A. Identification of entomopathogenic fungi, In: Lacey, L. A. (Ed.), **Manual of techniques in insect pathology**, second ed. Academic Press, Inc., California, USA, p. 151-187, 2012.
- IVERSEN, S.D., IVERSEN, L.L. Dopamine: 50 years in perspective. **Trends Neurosciense**, v.30, p.188-193,2007.
- KADOTA, K; SATOH, E; OCHIAI, M; INOUE, N; TSUJI, N; IGARASHI. I, et al. Existence of phenol oxidase in the argasid tick *Ornithodoros moubata*. **Parasitology Research**, v.88(8), p.781-784, 2002.
- KERNIF, T; LEULMI, H; RAOULT, D; PAROLA, P. Emerging Tick-Borne Bacterial Pathogens. **Microbiol Spectrum.**, v.4(3), p.10, 2016.
- KIM, D; ŠIMO, L; VANCOVÁ, M; URBAN, J; PARK, Y. Neural and endocrine regulation of osmoregulatory organs in tick: recent discoveries and implications. **General Comparative Endocrinology.**, v.278, p.42-9, 2019.
- KLAFKE, G.M; CASTRO-JANER, E; MENDES, M.C; NAMINDOME, A; SCHUMAKER, T.T.S. Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Vet Parasitology**, v.184(2-4), p.212-20, 2012.
- KLAFKE, G; WEBSTER, A; DALLAGNOL, B; PRADEL, E; SILVA, J; DE LA CANAL, L.H; BECKER, M; OSO RIO, M.F, et al. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. **Ticks Tick Borne Diseases.**, v.8(1), p.73-80, 2017.
- KONG, H; DONG, C; TIAN, Z; MAO, N; WANG, C; CHENG, Y; ZHANG, L; JIANG, X; LUO, L. Altered immunity in crowded *Mythimna separata* is mediated by octopamine and dopamine. **Scientific Reports**, v. 8, p.1-10, 2018.
- KUKLINSKI, N.J; BERGLUND, E.C; ENGELBREKSSON, J. EWING, A.G. Determination of salsolinol, norsalsolinol, and twenty-one biogenic amines using micellar electrokinetic capillary chromatography-electrochemical detection. **Electrophoresis.**, v.31(11), p.1886-93, 2010.
- KOPACEK, P; HAJDUSEK, O; BURESOVA, V; DAFFRE, S. Tick innate immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 708, p.137-162, 2010.
- LAINO, A; LAVARIÁS, S; SUÁREZ, G; LINO, A. CUNNINGHAM, M. Characterization of phenoloxidase activity from spider *Polybetes pythagoriucus* **Hemocyanin**, v.323, p.547-555, 2015.
- LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster* **Annual Review of Immunology**, v.25, p.697-743, 2007.
- LOOSOVÁ, G; JINDRÁK, L; KOPÁČEK, P. Mortality caused by experimental infection with the yeast *Candida haemulonii* in the adults of *Ornithodoros moubata* (Acarina:Argasidae). **Folia Parasitology**, v.48(2), p.149-53, 2001.

- LING, E., YU, X.Q. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.**, v.35, p.1356-1366,2005.
- LIU, H; JIRAVANICHPAISAL, P; CERENIUS, L; Lee, B.L; SÖDERHÄLL, I; SÖDERHÄLL, K. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Biology Chemistry**, v.282, p.33593–33598, 2007.
- MAINA, U.M; GALADIMA, I.B; GAMBO, F.M; ZAKARIA. D. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.6(1), p. 27-32, 2018.
- MARCIANO, A.F; MASCARIN, G.M; FRANCO, R.F.F; GOLO, P.S, JARONSKI, S.T; FERNANDES, É.K.K, et al. Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. **Scientific Reports**,v.11(1), p.1-11, 2021.
- 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.
- MASCARIN, G.M; LOPES, R.B; DELALIBERA, Í; FERNANDES, É.K.K; LUZ, C; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology.**, v.165, p.46–53, 2019.
- MELLO, C.B; GARCIA, E.S; RATCLIFFE, N.A; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. **Journal Invertebrate Pathology**. v.65, p.261–8, 1995.
- MESQUITA, E; MARCIANO, A.F; CORVAL, A.R.C; FIOROTTI, J; CORRÊA, T.A; QUINELATO, S, et al. Efficacy of a native isolate of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against larval tick outbreaks under semifield conditions. **BioControl.**, v.65(3), p.353–62, 2020.
- MEYER, J.M., EJENDAL, K.F., AVRAMOVA, L.V., GARLAND-KUNTZ, E.E., GIRALDO-CALDERON, G.I, BRUST, T.F., WATTS, V.J., HILL, C.A., 2012. A "genome-to-lead" approach for insecticide discovery: pharmacological characterization and screening of *Aedes aegypti* D(1)-like dopamine receptors. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 6, 2012.
- MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Editora Gen/Roca. v.1, 370p, 2017.
- MURREL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Crutice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systems Parasitology**, v.56, p.169-172, 2003.
- MUSTARD, J. A.; BEGGS, K. T.; MERCER, A. R. Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. **Physiology**, v.59, p.103–117, 2005.
- NAPPI, A.J; CHRISTENSEN, B.M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.35(5), p.443–59, 2005.

- NAPOLITANO, A; DI DONATO, P; PROTA, G. New regulatory mechanisms in the biosynthesis of pheomelanins: rearrangement vs. redox exchange reaction routes of a transient 2H-1,4-benzothiazine-2-one-quinonimine intermediate. **Acta Gen.** v.1475, p.47–54, 2000.
- NATION, J.L. **Insect Physiology and Biochemistry**. 3. Ed. University of Florida, Gainesville, 672p, 2016.
- PAL, S; ST LEGER, R.J; WU, L.P. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*, **Journal Biology Chemical**, v. 282, p. 8969-8977, 2007.
- PEÑALVER, E.; ARILLO, A.; DELCLÒS, X.; PERIS, D.; GRIMALDI, D.A.; ANDERSON, S.R.; NASCIMBENE, P.C.; FUENTE, R.P. Ticks parasitised feathered dinosaurs as revealed by Cretaceous amber assemblages. **Nature Communications**, v.8, n.1924, 2017.
- PÉREZ-GONZÁLEZ, V.H; GUZMÁN-FRANCO, A.W; ALATORRE-ROSAS, R; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, A; CARRILLO-BENÍTEZ, M.G; BAVERSTOCK, J. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils, **Journal of Invertebrate Pathology**, v.119, p.54-56, 2004.
- 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.
- RECK, J; KLAFKE, G.M; WEBSTER, A; DALL'AGNOL, B; SCHEFFER, R; SOUZA, U.A, et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Vet Parasitology**, v.201(1–2):128–36, 2014.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R.I; JONSSON, N.N; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, v.117, p.3–29, 2017.
- 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.
- SCHOLTE, E.J; KNOLS, B.G.J; SAMSON, R.A; TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. **Journal of Insect Science**, v. 4, p. 19-24, 2004.
- SHAH, P.A.; PELL, J.K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 413-423, 2003.
- SHAW, D; WANG, X; BROWN, L. *et al.* Infection-derived lipids elicit an immune deficiency circuit in arthropods. **Nature Communication**, v. 8, 2017.
- SILVA, R.Z.; NEVES, P.M.O.J.; SANTORO, P.H.; CAVAGUCHI, S.A.; Efeito de Agroquímicos à Base de Óleo Mineral e Vegetal sobre a Viabilidade dos Fungos Entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Bainier. **BioAssay**, v.1 p.1-5, 2006.
- SIMO, L; KOCI, J; ZITNAN, D; PARK, Y. Evidence for D1 dopamine receptor activation by a paracrine signal of dopamine in tick salivary glands. **PLoS One**, v.6, 2011.
- SODERHALL LL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v.10, p.23–28, 1998.

- ST LEGER, R. J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p.271-276, 2008.
- STANLEY, D.; MILLER, J.; TUNAZ, H. Eicosanoid Actions in Insect Immunity. **Journal of Innate Immunity**, v.1, n.4, 2009.
- STERBA, J; DUPEJOVA, J; FISER, M; VANCOVA, M.; GRUBHOFFER, L. Fibrinogen-related proteins in ixodid ticks. **Parasites and Vectors**, v.4, p.127, 2011.
- 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.
- URBANOVA, V; HAJDUŠEK, O; MONDEKOVA, H.H; ŠÍMA, R; KOPAČEK, P. Tick thioester-containing proteins and phagocytosis do not affect transmission of *Borrelia afzelii* from the competent Vector *Ixodes ricinus*. **Frontiers in Cell Infect Microbiology**, v.7(73), 2017.
- URBANOVÁ, V; HARTMANN, D; GRUNCLOVÁ, L; ŠÍMA, R; FLEMMING, T; HAJDUŠE, O. IrFC – An *Ixodes ricinus* injury-responsive molecule related to Limulus Factor C. **Developmental & Comparative Immunology**, v.46, p.439-447, 2014.
- VALICENTE, F.H. Controle biológico de pragas com entomopatogênos. **Informe Agropécuario**, v.30 p.48-55, 2009.
- VEGA, F. E.; MEYLING, N.; LUANGSA-ARD, J.; BLACKWELL, M. Fungal Entomopathogens. **Insect Pathology**, p.171-220, 2012.
- WU, S.F; XU, G; STANLEY, D; HUANG, J; YE, G.Y. Dopamine modulates hemocyte phagocytosis via a D1-like receptor in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. **Scientific Reports.**, v.5, p.1–13, 2015.
- ZHIOUA, E; YEH, M.T; LEBRUN, R.A. Assay for phenoloxidase activity in *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis*. **Journal Parasitology**, v.83(3), p.553-4, 1997.