

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

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO DE VIAS METABÓLICAS E COMPOSIÇÃO LIPÍDICA
DO CORPO GORDUROSO DE *Rhipicephalus microplus*
INFECTADOS POR DIFERENTES ISOLADOS DE *Metarhizium*
anisopliae sensu lato**

Fillipe Araujo de Sá

2014



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

**AVALIAÇÃO DE VIAS METABÓLICAS E COMPOSIÇÃO
LIPÍDICA DO CORPO GORDUROSO DE *Rhipicephalus
microplus* INFECTADOS POR DIFERENTES ISOLADOS DE
Metarhizium anisopliae sensu lato**

FILLIPE ARAUJO DE SÁ

Sob a Orientação da Professora
Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

e Co-orientação do Professor
Dr. Mário Alberto Cardoso Silva-Neto

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2014

595.429

S111a

T

Sá, Fillipe Araújo de, 1989-
Avaliação de vias metabólicas e
composição lipídica do corpo
gorduroso de *Rhipicephalus
microplus* infectados por diferentes
isolados de *Metarhizium anisopliae*
sensu lato / Fillipe Araújo de Sá -
2014.

67 f. : il.

Orientador: Vânia Rita Elias
Pinheiro Bittencourt.

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

Bibliografia: f. 37-53.

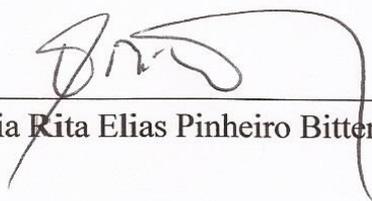
1. Carrapato - Controle - Teses.
2. *Rhipicephalus microplus* - Teses.
3. Fungos entomopatogênicos -
Teses. 4. *Metarhizium anisopliae* -
Teses. I. Bittencourt, Vânia Rita
Elias Pinheiro, 1959-. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias. III.
Título.

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

FILLIPE ARAUJO DE SÁ

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

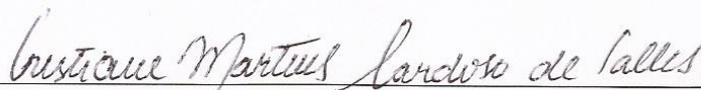
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2014



Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt, Dra, UFRRJ



Isabela Barbosa de Ramos, Dra. UFRJ



Cristiane Martins Cardoso de Salles, Dra UFRRJ

***Dedico este trabalho,
Aos meus pais, Nádia e Carlos,
À minha família,
Aos meus amigos,
Aos meus colegas e amigos de laboratórios,
À minha querida UFRRJ!***

“ Bem aventurados sejam aqueles que amam essa desordem ”

(Biquini Cavado)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por toda honra e toda glória em minha vida, por tudo que Ele tem feito e me guiado para essa vitória.

Aos meus pais, por todo investimento, por toda força, por toda paciência, amor e dedicação que me fizeram chegar até esse momento.

À minha avó Deuzuita que sempre esteve atenta e cuidadosa, mesmo me assustando no meio desse caminhar, permaneceu forte e me apoiando.

Aos meus avôs paternos que sempre me incluíram em suas orações.

Às minhas tias e tios por toda força e carinho dados a mim.

Aos meus cães Pitucho (*in memoriam*) e Xuxa, pois sem eles, jamais teria escolhido essa nobre profissão.

À minha querida orientadora professora Dra. Vânia Bittencourt por ter me acolhido ainda no início da graduação, por todas as bolsas, conselhos, broncas que me ajudaram e muito a chegar até esse momento.

Ao querido co-orientador Dr. Mário Silva-Neto por ter me acolhido e ajudado quando eu saí da Rural rumo à UFRJ bater em sua porta e pedir ajuda ainda em minha iniciação científica.

Aos meus amigos de LCM: Jôsie Marcelle, Caio Rodrigues, George Kluck, Allan Marciano, Jéssica Fiorotti, Luciana Souza, Maria Clemente, Thamiris Tavares, Michel Nogueira, Patricia Golo, Mariana Camargo, Caio Monteiro, Simone Quinelato, Wendell Marcelo e Isabele Ângelo por toda ajuda, paciência(e muita rs) e ensinamentos nesse longo período juntos.

Todos os amigos do Labisicel: Ana Dutra, Bia Batemarco, Bianca, Bruna Iaciura, Carlos Renato, Carlúcio, Cecília Cudischevitch, Débora Moretti, Guilherme Ventura, Karina Cardoso, Katia Laia, Leonardo, Patricia Sardella, Pollyana Barcelos, Priscilla Medeiros, Pingo, Rodrigo Dutra e Willy Jablonka por terem me acolhido tão bem, me permitindo “invadir” sempre seus espaços e me ensinado muito.

Ao Flamengo, meu time de coração, responsável por alegrias inexplicáveis, arrepios apaixonados e glórias inenarráveis. Meu sangue é vermelho e preto, eu teria um desgosto profundo se faltasse o Flamengo no mundo.

Aos meus amigos ruralinos e cturianos, dos quais não citarei os nomes para não ser injusto, por todos os momentos de diversão e aprendizado.

Aos colegas de estação Otávia, Paula, Candida, Nelson, Soraia, Rafa, Juliana, Andresa, Jéssica Ferreira, Larissa Amorim, Renata Lins, Gabi Vitari, Maristela Peckle, Antonio, Thiago, Marcus Sandes e Larissa Clara por toda ajuda, momentos divertidos e companheirismo.

A todos os professores do CGPCV e do IBQM que tenham me ensinado e auxiliado nesse período de muito aprendizado e a todos meus colegas de turma que dividiram afazeres e compartilharam conhecimento comigo durante as aulas.

RESUMO

SÁ, Fillipe Araujo de. **Avaliação de vias metabólicas e composição lipídica do corpo gorduroso de *Rhipicephalus microplus* infectados por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* sensu lato.** 2014. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2014.

O fungo *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) apresenta-se como um enorme potencial para o controle da população de carrapatos. Apesar da grande importância do corpo gorduroso no metabolismo dos artrópodes, os estudos do papel desse tecido como uma fonte de controle potencial das infestações de carrapatos são escassos. Esse trabalho avaliou a composição lipídica e a ativação das enzimas ERK e AMPK em corpo gorduroso de *Rhipicephalus microplus* após a infecção por diferentes isolados do fungo *M. anisopliae* s.l.. Os isolados utilizados no estudo foram CG 32, CG 112, CG 148, CG 347 e CG 629 e foram inoculados sob a forma de conídios viáveis ou inviáveis. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas foram dissecados e seus corpos gordurosos foram coletados 24 e 48 horas após a infecção. Os tecidos foram homogeneizados, congelados, sonicados e centrifugados para a extração de proteínas. A composição lipídica foi avaliada pela técnica de cromatografia em camada delgada. As alterações em enzimas-chaves de importantes vias metabólicas foram detectadas através da técnica de *Western Blotting* utilizando anticorpos contra resíduos protéicos fosforilados em tirosina, em serina e contra as enzimas AMPK e ERK fosforiladas e tubulina como controle de carregamento. O estudo demonstrou um aumento nos níveis de triacilglicerol 24 e 48 horas e de ácido graxo após 48 horas após a inoculação de fungos viáveis na hemocele do carrapato. A detecção da forma ativa de ERK foi evidenciada apenas com a inoculação do fungo inativado na hemocele, demonstrando que a ativação dessa via por parte do carrapato. Já para detecção de AMPK fosforilada, apenas o isolado CG 112 foi capaz de aumentar a ativação dessa enzima estando viável ou não, enquanto os isolados CG32 e CG 629 foram capazes de manipular positivamente essa via ao serem inoculados na forma inativada no carrapato. Esse estudo demonstra, pela primeira vez, alterações em importantes vias metabólicas em carrapatos infectados por um fungo entomopatogênico. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar essa interação entre patógeno e hospedeiro.

Palavras-chave: *Rhipicephalus microplus*, *Metarhizium anisopliae* sensu lato, triacilglicerol, AMPK, ERK.

ABSTRACT

SÁ, Fillipe Araujo de. **Evaluation of lipid composition and signaling pathways in fat body of *Rhipicephalus microplus* infected with different strains of *Metarhizium anisopliae* sensu lato.** 2014. 70p. Dissertation (Master Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014

The fungus *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) presents as a huge potential for the control of tick populations. Despite the importance of the fat body in arthropods metabolism and the potential of such pathways as targets to block the spread of such pathogens, studies in ticks are still scarce. This study evaluated the lipid composition and activation of ERK and AMPK enzymes in *Rhipicephalus microplus* fat body after infection with different isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* sensu lato. The isolates CG 32, GC 112, GC 148, GC 347 and GC 629 were inoculated as viable or non-viable conidia in the ticks. The engorged females were dissected and their fat bodies were collected 24 and 48 hours after infection. The lipid composition was assessed by thin layer chromatography (TLC) and enzyme activation was detected by Western blotting with antibodies against serine phosphorylation, tyrosine phosphorylation, p-AMPK and p-ERK. The study showed increased levels of triacylglycerol 24 and 48 hours and fatty acid after 48 hours post inoculation of viable fungi in the tick's hemocoel. The detection of the active form of ERK was demonstrated only after inoculation of non-viable conidia of all isolates tested. On the other hand, to the phosphorylated AMPK, only the isolate CG 112 was able to activate with viable or non-viable conidia, whereas isolates CG 32 and CG 629 were able to activate only with non-viable conidia. This study provides the first report about changes in important metabolic pathways in ticks infected with entomopathogenic fungi. However, further studies may be necessary for a better elucidation of this interaction.

Key-words: *Rhipicephalus microplus*, *Metarhizium anisopliae* sensu lato, triacylglycerol, AMPK, ERK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de ativação da proteína AMPK e suas regulações. Adaptado de RUDERMAN et al. (2010) 11

Figura 2. Esquema da via de ativação da enzima ERK, também chamada de via Ras-Raf-MEK-ERK pela sequência de enzimas pertencentes a essa via. Retirado de <http://en.wikipedia.org/wiki/File:MAPKpathway.png> 18

Figura 3. Composição de lipídeos neutros nos trofócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por inoculação de suspensão conidial de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. coletados 24 horas após o tratamento. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à densitometria pelo programa ImageMaster TotalLab. Cada grupo continha 10 fêmeas. CHOE: Colesterol esterificado; TAG: Triacilglicerol; AG: Ácido graxo livre; CHO: Colesterol. 21

Figura 4. Percentual de triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* no período de 24 horas após o tratamento inoculação de suspensão conidial de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. viáveis e inativados. Valores obtidos a partir da análise densitométrica utilizando o programa Image Master Totallab. As barras representam a média \pm o erro padrão e os asteriscos representam diferença estatística a 5% de significância comparado ao controle segundo o teste de Tukey. 22

Figura 5. Composição de lipídeos neutros nos trofócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por inoculação de suspensão conidial de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. coletados 48 horas após o tratamento. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à densitometria pelo programa ImageMaster TotalLab. Cada grupo continha 10 fêmeas. CHOE: Colesterol esterificado; TAG: Triacilglicerol; AG: Ácido graxo livre; CHO: Colesterol. 23

Figura 6. Percentual de triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* no período de 48 horas após o tratamento inoculação de suspensão conidial de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. viáveis e inativados. Valores obtidos a partir da análise densitométrica utilizando o programa Image Master Totallab. As barras representam a média \pm o erro padrão e os asteriscos representam diferença estatística a 5% de significância comparado ao controle segundo o teste de Tukey. 24

Figura 7. Perfil de fosforilação em tirosina em células de corpo gorduroso de *Rhipicephalus microplus* após 24 horas de tratamento com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l.. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 μ g de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra pTyr (PY99 SC 7020) e reveladas em kit ECL. 25

Figura 8. Perfil de fosforilação em tirosina em células de corpo gorduroso de *Rhipicephalus microplus* após 48 horas de tratamento com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra pTyr (PY99 SC 7020) e reveladas em kit ECL. 25

Figura 9. Perfil de fosforilação em serina em células de corpo gorduroso de *Rhipicephalus microplus* após 24 horas de tratamento com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra pSer(SC-81514) e reveladas em kit ECL. 26

Figura 10. Perfil de fosforilação em serina em células de corpo gorduroso de *Rhipicephalus microplus* após 48 horas de tratamento com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l.. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra pSer(SC-81514) e reveladas em kit ECL. Em destaque, as bandas que se apresentaram de forma diferente entre os grupos. 27

Figura 11. Detecção de fosforilação da enzima ERK em corpos gordurosos de *Rhipicephalus microplus* após período de 24 horas de tratamento por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra ERK 1/2 fosforilada (1:1000) e contra tubulina (1:10000), revelado por ECL. Foi realizada a densitometria da banda determinada com o programa Image Master Totallab. As barras representam a média ± o erro padrão e os asteriscos representam diferença estatística a 5% de significância segundo o teste de Tukey quando comparados ao controle. CTR = controle; H₂O = água destilada estéril acrescida de tween 80 0,01% 28

Figura 12. Detecção de fosforilação da enzima ERK em corpos gordurosos de *Rhipicephalus microplus* após o período de 48 horas de tratamento por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra ERK 1/2 fosforilada (1:1000) e contra tubulina (1:10000), revelado por ECL. Foi realizada a densitometria da banda determinada com o programa Image Master Totallab. As barras representam a média ± o erro padrão e os asteriscos representam diferença estatística a 5% de significância segundo o teste de Tukey quando comparados ao controle. CTR= controle; H₂O= água destilada estéril acrescida de tween 80 0,01% 29

Figura 13. Detecção de fosforilação da enzima AMPK em corpos gordurosos de *Rhipicephalus microplus* após o período de 24 horas de tratamento por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra AMPK fosforilada (1:1000) e contra tubulina (1:10000), revelado por ECL. Foi realizada a densitometria da banda determinada com o programa Image Master Totallab. As barras representam a média ± o erro padrão e os asteriscos representam diferença estatística a 5% de significância segundo o teste de Tukey quando comparados ao controle. CTR= controle; H₂O= água destilada estéril acrescida de tween 80 0,01%.

30

Figura 14. Detecção de fosforilação da enzima AMPK em corpos gordurosos de *Rhipicephalus microplus* após o período de 48 horas de tratamento por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra AMPK fosforilada (1:1000) e contra tubulina (1:10000), revelado por ECL. Foi realizada a densitometria da banda determinada com o programa Image Master Totallab. As barras representam a média ± o erro padrão e os asteriscos representam diferença estatística a 5% de significância segundo o teste de Tukey quando comparados ao controle. CTR= controle; H₂O= água destilada estéril acrescida de tween 80 0,01%.

31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. com seus respectivos hospedeiros ou substrato e origens.

15

Tabela 2. Identificação dos grupos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* estabelecidos nos tratamentos utilizando diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l.

16

LISTA DE ABREVIACOES

% - porcentagem
°C – graus Celsius
µg - micrograma
µL –microlitro
ACC – Acetyl-CoA carboxylase (Acetil-CoA carboxilase)
ADP - Adenosine diphosphate (adenosina difosfato)
AG – Ácido Graxo
Ala – Alanina
AMP- Adenosine monophosphate (adenosina monofosfato)
AMPc – AMP cíclico
AMPK - AMP-activated protein kinase (cinase ativada por AMP)
ATP- Adenosine triphosphate (adenosina trifosfato)
CAMKK - Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase (proteína cinase cinase dependente de Ca/calmodulina)
CG - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CenarGen)
CHO - colesterol
CHOE – Colesterol esterificado
CTR – Controle
EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido tetraacético etilenodiamino)
ERK - Extracellular signal-regulated kinases (cinase regulada por sinal extracelular)
FABP - Fatty acid-binding protein (proteína ligadora a ácido graxo)
FAS – Fatty Acid Synthase (Ácido Graxo Sintase)
FAT/CD36 - Fatty Acid Translocase/Cluster of Differentiation 36 (Ácido graxo translocase/grupo de diferenciação 36)
g – força da gravidade
GDP - Guanosine-diphosphate (Guanosina-difosfato)
GPAT - Glycerol-phosphate acyltransferases (glicerol-fostato-aciltransferase)
GRB2 - Growth factor receptor-bound protein 2 (Receptor de fator de crescimento ligado a proteína 2)
GTP - Guanosine-5'-triphosphate (Guanosina-5'-trifosfato)
H₂O – Água
HMG-CoA redutase - (Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase)
HSL - Hormone Sensitive Lipase (lipase hormônio sensível)
kDa – kilodaltons
kV - kilovolts
LKB1 - Liver Kinase B1 (cinase B1 do fígado)
L-PK – Piruvate Kinase (Piruvato cinase)
M – molar
mA – miliamper
MAPK - Mitogen-activated protein kinase (proteínas cinases ativadas por mitógenos)
MEK - Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase (Proteína cinase cinase de dupla especificidade ativada por mitógenos)
min-minuto
mL- mililitro
mm - milímetro
mM - milimolar
N₂ – Gás Nitrogênio
NaCl – Cloreto de Sódio

NaF – Fluoreto de Sódio
NAOH – Hidróxido de Sódio
p/v – Peso/volume
PAO - Phenylarsine Oxide (Óxido de Fenilarsina)
PBS – Phosphate Saline Buffered (Solução salina tamponada com fosfato)
PI3K – Phosphatidil-Inositol-3- phosphate kinase (Fosfatidil-Inositol-3- fosfato cinase)
PKA – Proteína cinase A
PKC – Proteína cinase C
PLC – Phospholipase C (Fosfolipase C)
PMSF - Phenylmethylsulfonyl Fluoride (Fluoreto de fenilmetilsufonil)
PP2A – Protein Phosphatase 2A (proteína fosfatase 2A)
PP2C – Protein Phosphatase 2A (proteína fosfatase 2C)
PVDF - Polyvinylidene fluoride (Fluoreto de Polivinilideno)
s.l. – sensu lato
SAPK/JNK - Stress-Activated Protein kinases/ c-Jun N-terminal kinase (Proteína cinase ativada por estresse/ c-Jun N terminal cinase)
SDS - sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels electrophoresis
Ser – Serina
SKT11 - Serine/threonine kinase 11 (serina/treonina cinase 11)
SREBP - Sterol regulatory element-binding protein (proteína de ligação ao elemento regulatório de esteroide)
s-segundo
TAG – Triacilglicerol
TBS - Tris-buffered saline (Solução salina tamponada com Tris)
TBS-T - Tris-buffered saline and Tween 20 0,1% (Solução salina tamponada com Tris acrescido de Tween 20 0,1%)
Thr – Treonina
TLC - Thin Layer Chromatography (cromatografia em camada delgada)
Tris – Trishydroxymethylaminomethane
Tyr – Tirosina
UR – umidade relativa
V - volts
v/v – Volume/volume
W – watts
Xaa – Aminoácido desconhecido ou inespecífico
ZMP - 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranosil-5'-monofosfato)

SUMÁRIO

| | | |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| | O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> | 3 |
| | Corpo Gorduroso | 5 |
| | <i>Metarhizium anisopliae</i> | 6 |
| | Controle biológico por entomopatogênicos | 7 |
| | A proteína cinase ativada por AMP (AMPK) | 10 |
| | Proteína cinase ativada por estímulo extracelular (ERK) | 12 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 3.1 | Localização do Experimento | 15 |
| 3.2 | Manutenção das colônias de <i>Metarhizium anisopliae</i> sensu lato(s.l.) | 15 |
| 3.3 | Obtenção das suspensões de <i>M. anisopliae</i> s.l. | 15 |
| 3.4 | Viabilidade dos conídios | 15 |
| 3.5 | Obtenção da colônia de <i>Rhipicephalus microplus</i> | 16 |
| 3.6 | Tratamento as fêmeas por inoculação: | 16 |
| 3.7 | Coleta de Corpo Gorduroso periférico: | 17 |
| 3.8 | Análise de Proteínas | 17 |
| 3.8.1 | <i>Extração de Proteínas</i> | 17 |
| 3.8.2 | <i>Dosagem de Proteína</i> | 17 |
| 3.9 | Análise do Perfil Lipídico | 17 |
| 3.9.1 | <i>Extração dos Lipídios</i> | 17 |
| 3.9.2 | <i>Corrida Unidimensional</i> | 18 |
| 3.9.3 | <i>Revelação das placas</i> | 18 |
| 3.10 | Gel de Eletroforese (SDS-Page) | 18 |
| 3.10.1 | <i>Preparo das amostras</i> | 18 |
| 3.10.2 | <i>Preparo dos Géis de Eletroforese</i> | 18 |
| 3.10.3 | <i>Eletroforese</i> | 19 |
| 3.11 | Western Blotting | 19 |
| 3.12 | Análise estatística | 19 |
| 4 | RESULTADOS | 21 |
| 4.1 | Viabilidade dos conídios | 21 |
| 4.2 | Análise do perfil lipídico | 21 |
| 4.3 | Modulação de vias metabólicas | 24 |
| 4.3.1 | p-Tyr | 24 |
| 4.3.2 | p-Ser | 26 |
| 4.3.1 | p-ERK | 27 |
| 4.3.2 | p-AMPK | 29 |
| 5 | DISCUSSÃO | 32 |
| 5.1 | Alterações no metabolismo lipídico | 32 |
| 5.2 | Alterações em vias metabólicas | 33 |
| 6 | CONCLUSÕES | 36 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 37 |

1 INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasito responsável por grandes perdas econômicas na pecuária bovina. A distribuição deste carrapato é favorecida por fatores ambientais como temperatura elevada e alta umidade relativa do ar, estando amplamente disperso no Brasil. A infestação por esse ectoparasito causa aos animais danos diretos, como desconforto, irritação, anemia, depreciação do couro, predisposição a miíases, e indiretos, por ser importante vetor de agentes, como *Babesia* spp e *Anaplasma* sp que fazem parte do complexo da Tristeza Parasitária Bovina, podendo levar até a morte do bovino. Os prejuízos ligados a essa ectoparasitose chegam à cerca de dois bilhões de dólares anuais somente no Brasil (GRISI et al., 2002).

Para minimizar esses prejuízos, o controle por acaricidas químicos é utilizado há décadas. Porém, o uso indiscriminado dessas substâncias leva a graves problemas como contaminação ambiental, presença de resíduos químicos na carne e leite (inviabilizando o comércio para alguns países) e o desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes (GEORGE et al., 2004). Sendo assim, métodos alternativos vêm sendo estudados para diminuir esse impacto ambiental, dentre eles um que merece destaque é através de fungos entomopatogênicos.

Metarhizium anisopliae sensu lato (s.l.) e *Beauveria bassiana* s.l. são fungos cosmopolitas comumente isolados do solo e conhecidamente entomopatogênicos. Estudos descrevem a capacidade patogênica desses agentes contra artrópodes, incluindo carrapatos da espécie *R. microplus* (FERNANDES et al, 2008). Quinelato et al. (2012) demonstraram que diferentes isolados de *M. anisopliae* (s.l.) possuem diferentes níveis de virulência sobre larvas de *R. microplus*.

Em um desafio ao organismo do artrópode, há ativação de diversas vias metabólicas, principalmente responsáveis por vias catabólicas que sejam capazes de aumentar a energia celular, na tentativa do controle da infecção e de manutenção do metabolismo basal.

O passo inicial para esse processo catabólico é a quebra de triacilglicerol em ácidos graxos. Esse processo, conhecido como lipólise, ocorre em mamíferos pela ação da lipase hormônio-sensível e tem ação mediada por importantes vias como AMPK e ERK. Por esse motivo, o corpo gorduroso parietal, principal órgão de reserva de lipídios (principalmente, triacilglicerol e colesterol), ganha destaque e importância no estudo da infecção do carrapato por fungos e outros patógenos.

Durante a infecção pelo isolado Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. há, paradoxalmente, um aumento de triacilglicerol e colesterol esterificado no corpo gorduroso de *R. microplus* após 48 horas de infecção (ANGELO et al., 2013).

A proteína cinase ativada por AMP (AMPK) induz uma ampla cascata de eventos catabólicos para a manutenção da energia celular em períodos de privação energética. Sua ativação é mediada pelo desequilíbrio nas concentrações de AMP-ATP (essencial para a célula); como o próprio nome da enzima diz, o AMP gera uma alteração conformacional na molécula de forma a expor resíduo de serina que pode ser fosforilado por uma série de cinases responsáveis pela ativação dessa enzima. O AMP ligado a AMPK também modula positivamente sua atividade (aumentando a atividade catalítica e diminuindo a susceptibilidade à defosforilação). Para o metabolismo lipídico, a AMPK é capaz de modular negativamente a acetil CoA carboxilase (ACC), glicerol-fosfato-acil transferase (GPAT) e a HMGCoA redutase, enzimas-chaves na síntese de ácido graxo, triglicérides e de colesterol, respectivamente. Além disso, é capaz de inibir a lipólise por ação sobre a lipase hormônio-sensível (HSL) (TOWLER; HARDIE, 2007).

A proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK), uma das enzimas das subfamílias das MAPK, diretamente ou por meio de sua via sinalizadora tem papel

fundamental em importantes eventos celulares como expressão gênica, diferenciação celular, proliferação, além de outras vias importantes para a homeostase celular. Dentre as suas ações, pode-se destacar o controle da lipólise por *downregulation* da expressão de perilipina e ativação da HSL que permite a liberação de triacilglicerol de adipócitos em mamíferos (GEHART et al, 2010).

Apesar da importância econômica elevada, as vias de sinalização de metabolismo energético e lipídico ainda são desconhecidas ou pouco estudadas em carrapatos. Elucidar possíveis pontos chave no metabolismo e resposta imune desse carrapato vem a ser importante para o desenvolvimento de formulações de controle desse vetor.

O trabalho teve como objetivo avaliar a composição lipídica do corpo gorduroso de *R. microplus* e determinar a ativação de vias metabólicas (AMPK e ERK) após a infecção artificial por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O carrapato *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1887 (MURREL; BARKER, 2003) pertence ao Filo Arthropoda, Classe Aracnida, Subclasse Acari, Ordem Parasitiformes, Subordem Ixodida, Superfamília Ixodoidea, Família Ixodidae, Subfamília Rhipicephalinae (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

Com o avanço das pesquisas no campo molecular, estudos recentes de revisão dos gêneros *Boophilus* e *Rhipicephalus*, junto com estudos morfológicos anteriores, evidenciaram grande similaridade entre esses dois gêneros, sendo assim proposto que as cinco espécies descritas anteriormente como pertencentes ao gênero *Boophilus* passassem a pertencer ao gênero *Rhipicephalus*. Desta forma, o gênero *Boophilus* foi abolido e reclassificado como subgênero de *Rhipicephalus* (BEATI; KEIRANS, 2001; MURREL; BARKER, 2003).

É um ectoparasito de origem asiática, mais especificamente da região da Índia e Ilha de Java (WHARTON, 1974). Sua dispersão pelo restante do mundo ocorreu durante as expedições exploratórias durante a Era das Grandes Navegações e, também, pela importação de gado asiático pelas colônias que se localizavam nas regiões tropicais e subtropicais, como América Central, América do Sul e África (GONZÁLES, 2002), tendo se estabelecido entre os paralelos 40°Norte e 30°Sul, excetuando-se áreas de altitude muito elevadas ou muito áridas (FURLONG, 2002). Estudos recentes, apontam que o carrapato que parasita o gado bovino no continente da Oceania pertence à espécie *R. australis*, e não a *R. microplus* como acreditava-se (ESTRADA-PEÑA et al., 2012).

O hospedeiro preferencial de *R. microplus* é o bovino, podendo também infestar outros animais em épocas de grande infestação nas pastagens (GONZÁLES, 1974), porém sem a mesma eficiência (ROCHA, 1999; PEREIRA, 2008; FRANQUE et al., 2009). Dentre os bovídeos, as maiores infestações ocorrem em gado europeu (*Bos taurus*) quando comparados ao gado zebuino (*Bos indicus*) (OLIVEIRA et al., 1989; ROCHA, 1999), devido a fatores genéticos que desencadeiam uma série de características nesses animais (principalmente na pele e no sistema imunológico) (PIPER et al., 2008; CONSTANTINOIU et al., 2010; RODRIGUEZ-VALLE et al., 2010). Fatores como a idade, sexo e estado nutricional estão relacionados com a sensibilidade do bovino ao carrapato (SUTHERST et al., 1979).

É um carrapato monoxeno, ou seja, seu ciclo de vida é dividido em fase de vida livre, que ocorre desde a queda da fêmea ao solo até a fixação da larva em um hospedeiro, e fase de vida parasitária, quando o carrapato passa a ingerir substratos teciduais e sangue e faz as ecdises necessárias para mudança de fase no ciclo de vida até o total ingurgitamento e queda ao solo para a postura de ovos.

O período de vida livre pode se estender durante 28 a 300 dias até a formação completa da larva e mais seis meses até a fixação da mesma sobre o hospedeiro (ROCHA, 1999). Essa imensa diferença de tempo deve-se à influência de variáveis climáticas. Em períodos secos e frios, de abril a setembro no Brasil, os números de larvas nas pastagens e de fêmeas adultas no animal diminuem significativamente e o ciclo se torna mais longo em relação aos períodos quentes e úmidos (a partir da primavera) quando ciclo é mais curto e há, também, maior taxa de sobrevivência e reprodução (KASAI et al., 2000; SILVA et al., 2010). Essa diferença ocorre mesmo em regiões quentes como o Sudeste brasileiro, deixando clara a influência da umidade e dos índices pluviométricos nessa conta.

Já o período parasitário, dura em média de 22 a 23 dias, apresentando pequenas variações em decorrência do clima, sendo bastante constante em todas as regiões (variando no máximo de 19 a 38 dias) (ROCHA, 1999). Essa fase se inicia após a fixação da larva ao hospedeiro, transformando em metalarva que passará por uma ecdise e se transformará em ninfa,

ganhando mais um par de patas. Durante o estágio ninfal se inicia o dimorfismo sexual. Após mais uma ecdise, dá origem à forma adulta quando ocorrerá a cópula e o início da formação e maturação dos ovos (que só vai terminar quando a fêmea já estiver no solo para a realização da postura (ROCHA, 1999; MORANDO; GELINSKI, 2010). Os machos possuem uma vida mais longa quando comparado a das fêmeas, sendo capazes de copular com diversas durante a sua vida adulta; os machos, também ingerem sangue e detritos teciduais, porém em bem menor quantidade (apenas para garantir seu metabolismo) (KISZEWSKI et al., 2001).

Todos os ixodídeos (carrapatos que possuem escudo dorsal) são anautógenos, ou seja, a hematofagia é imprescindível a esses ectoparasitas durante a fase sobre o hospedeiro, pois necessitam de material sanguíneo para produção, desenvolvimento e maturação dos ovos (KISZEWSKI et al., 2001).

O rebanho bovino brasileiro é o segundo em tamanho, ficando apenas atrás da Índia (que caracteriza-se por ter um grande rebanho não comercial) (FAO, 2011) alcançando, em torno, de 212 milhões de cabeças de gado, ou seja, maior que a população do país. Porém, em capacidade produtiva o Brasil ocupa a segunda posição em produção de carne, ficando atrás do rebanho americano, e, apenas, o sexto lugar em produção de leite (IBGE, 2011). Essa discrepância entre tamanho do rebanho e produtividade deve-se a graves problemas de manejo do gado, incluindo inadequado controle de endo e ectoparasitos (FURLONG, 2005). O prejuízo anual, apenas no Brasil, pelo parasitismo por *R. microplus* chega a dois bilhões de dólares anuais (GRIS et al., 2002), por perdas produtivas e gastos com tentativas de controle, que muitas vezes são inadequadas. O hábito hematófago oriundo do parasitismo leva a danos diretos ao animal como anemia (pela perda de sangue), danos ao couro, prurido, desconforto, imunossupressão e redução da ingestão de alimento, acarretando perdas sobre o ganho de peso, estado nutricional, crescimento e a produção do gado bovino (JONSSON, 2006). Além de danos diretos, a lesão causada pela espoliação da pele leva ao favorecimento do aparecimento de outras lesões cutâneas como infecções bacterianas secundárias e miíases (FURLONG, 2005; RECK et al., 2014), danificando ainda mais o couro que poderia ser vendido como subproduto da criação de gado; outros graves problemas indiretos de uma infestação por carrapato são a transmissão de diversos agentes patogênicos, principalmente *Babesia spp.* e *Anaplasma marginale*, ligados ao complexo de doenças denominado Tristeza Parasitária Bovina que podem levar a alta morbidade e, até mesmo, mortalidade do gado (JONSSON et al., 2008). A inoculação desses agentes ocorre durante o repasto sanguíneo, sendo excretados junto à saliva do carrapato para a corrente sanguínea do hospedeiro (GOHIL et al., 2013), sendo que em *A. marginale*, o provável vetor seja o macho de *R. microplus* e as larvas e ninfas são responsáveis pela veiculação de *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente (STILLER; COAN, 1995; GOHIL et al., 2013).

Apesar da importância econômica elevada, não há um programa governamental de controle dessa ectoparasitose, frequentemente ficando a cargo do próprio produtor, sem o auxílio de um profissional competente, a escolha de um tratamento, sendo muitas vezes inadequado (FURLONG, 2005). O controle químico vem sendo usado há anos e, ainda é a principal forma de controle utilizada na grande maioria dos rebanhos, porém, além de trazer um impacto ecológico significativo (BULLMAN et al., 1996), presença de resíduos na carne e leite (KUNZ; KEMP, 1994), há cada vez mais problemas com o desenvolvimento de cepas de carrapatos resistentes às principais bases químicas presentes no mercado como organofosforados (PATARROYO; COSTA, 1980), piretróides (NOLAN, 1989; MENDES et al., 2013) amitraz (SOBERANES et al., 2002), ivermectina (MARTINS; FURLONG, 2001), fipronil (CASTRO-JANER et al., 2010) e também a associações de duas ou mais drogas (BENAVIDES et al., 2000; FERNÁNDEZ-SALAS et al., 2012; POHL et al., 2012).

O desenvolvimento de uma nova base química que seja segura e eficaz é muito difícil e demandaria um altíssimo investimento financeiro (GRAF et al., 2004), sendo assim o uso de

métodos alternativos de controle vêm ganhando cada vez mais espaço e será posteriormente discutido nessa revisão de literatura.

Corpo Gorduroso

O corpo gorduroso dos artrópodes é um órgão de extrema importância metabólica e reprodutiva, especialmente em insetos. Como o próprio nome diz, a principal função desse órgão é a reserva energética, especialmente de lipídeos e glicídios, sendo os triglicerídeos, os mais abundantes em carrapatos e insetos (ANGELO et al., 2013; ARRESE; SOULAGES, 2010). Porém, esse órgão ainda possui muitas outras funções metabólicas como estocagem de aminoácidos, síntese de importantes proteínas da hemolinfa, produção de peptídeos antimicrobianos, produção de vitelogenina e detoxificação de metabólitos de nitrogênio (COHEN, 2009; LIPOVSEK et al., 2011).

Os trofócitos são o único tipo celular a compor esse órgão (SONENSHINE; ROE, 2013). Denardi et al. (2008) descreveram dois tipos de trofócitos: os arredondados e os cúbicos, que possuíam uma área citoplasmática menor. A forma cúbica estaria presente na forma de cordões celulares, enquanto a forma arredondada localizada de forma isolada acima desses cordões. Até o momento, não há descrição de variação funcional entre essas células na literatura.

O corpo gorduroso de carrapatos, assim como o dos insetos, se encontra em dois principais sítios de localização: associado a parede interna do tegumento, revestindo todo o idiossoma, intimamente ligado às traqueíolas componentes do sistema respiratório; e próximo ao sistema digestivo e reprodutor (SONENSHINE; ROE, 2013; DENARDI et al., 2008). Obenchain e Oliver (1973) denominaram essas regiões de central (ao redor dos órgãos) e periférico (disperso junto ao tegumento). No entanto, Denardi et al. (2008) propuseram utilizar a mesma terminologia que é usada em insetos, passando a ser aceito os termos parietal, substituindo periférico, e perivisceral, substituindo central, por ser mais adequada em relação a localização desses órgãos.

Em insetos, a porção perivisceral, intimamente ligada à região abdominal onde se localiza o intestino médio, está relacionada a atividades endócrinas de produção de moléculas carreadoras de substâncias pela hemolinfa e hormônios digestivos, produção de ferritina, vitelogênese, enquanto a porção associada ao tecido conjuntivo do exoesqueleto está relacionada a reserva de nutrientes, principalmente glicogênio e lipídios (CHAPMAN, 1998; SONENSHINE; ROE, 2013). Já em carrapatos, as funções metabólicas do órgão não são bem definidas, apenas aspectos estruturais são bem conhecidos, não havendo diferenças celulares e estruturais entre essas duas porções do órgão.

Ao contrário do corpo gorduroso dos insetos, em carrapatos esse órgão é menos evoluído. Dessa forma, as funções metabólicas são bastante reduzidas em comparação a estocagem lipídica, sendo altamente ativo após o período de alimentação (DENARDI et al., 2008; SONENSHINE; ROE, 2013).

Outra importante diferença entre carrapatos e insetos é a importância do órgão na vitelogênese, pois enquanto em insetos, o órgão é o único sítio de produção de vitelogenina, em carrapatos a produção é reduzida nesse local (que participa principalmente na produção de energia para esse processo ser realizado principalmente nos oócitos e células pedicelos do ovário e no intestino médio) (CAMARGO-MATHIAS, 2013).

O corpo gorduroso participa ativamente da resposta imune a injúrias nos insetos, com participação na produção de diversos peptídeos antimicrobianos (BULET et al., 1999). Em carrapatos, essa função imune está mais relacionada aos hemócitos que ficam dispersos pela hemolinfa, apesar disso, há presença de genes precursores de defensinas, incluindo a

microplusina por *R. microplus*, nos trofócitos, indicando a produção dessas moléculas nesse órgão em carrapatos (FOGAÇA et al., 2004),

Rezende (2013) detectou a presença de receptores do tipo *Toll-like* em trofócitos arredondados de *R. microplus*, que sofria um aumento de expressão mediante infecção fúngica por *B. bassiana* s.l., sugerindo a participação desse tipo celular, de forma ativa, em desafios imunes a esse carrapato

***Metarhizium anisopliae* sensu lato**

Os hipomicetos do gênero *Metarhizium* (Mestchikoff) Sorokin (1883) (Hypocreales: Clavicipitaceae) são fungos filamentosos, que são encontrados em solo, na rizosfera de plantas ou em cadáveres de artrópodes de quase todo o planeta, com exceção ao continente antártico (apesar de possuir isolamentos próximos ao círculo Antártico) (ROBERTS; ST. LEGER, 2004; SCHARANK; VAINSTEIN, 2010). É um fungo de micélio esbranquiçado a amarelado, tendo coloração totalmente esverdeada (oliváceo) quando o conídio, uninucleado e cilíndrico, se torna maduro (BISCHOFF et al., 2009).

Metarhizium anisopliae sensu lato (s.l) é um fungo mesofílico, ou seja, capaz de crescer em uma faixa de temperatura geral de 15 a 35°C, tendo uma temperatura ótima para o crescimento e a germinação entre 25 e 30°C (MILNER et al., 2003). Porém, diversos estudos envolvendo termotolerância já foram realizados, demonstrando a presença de isolados e espécies tolerantes a frio e a calor (YIP et al., 1992; BIDOCHKA et al., 2001; FERNANDES et al., 2008). Por exemplo, a espécie *M. acridum* possui alta tolerância ao calor, havendo crescimento de alguns conídios mesmo após expostos a temperatura de 45°C, já *Metarhizium* do complexo *flaviviride* apresentou alta atividade em baixa temperatura (5°C) (FERNANDES et al., 2010).

Outro fator abiótico de grande importância para a sobrevivência e infectividade fúngica é a umidade relativa. Os entomopatógenos necessitam de alta taxa de umidade relativa para germinarem, geralmente entre 80-90% (ZIMMERMANN, 2007a). Porém, estudos anteriores relatam germinação de conídios a baixa umidade (RIBEIRO et al., 1992; BATEMAN et al., 1993) demonstrando que apesar de muito importante e influenciar diretamente na eficácia da germinação, baixa umidade não é um fator limitante para esse processo por si só.

Por sua vez, o principal fator limitante da eficiência do fungo no ambiente e em trabalhos a campo é a radiação ultravioleta (emitida pelo sol) (CAGAN; SVERCEL, 2001), inativando o conídio, podendo levar a danos ao DNA e induzir mutações gênicas (NICHOLSON et al., 2000). Diversos trabalhos envolvendo radiação solar demonstraram que conídios expostos por poucas horas a raios de luz UV-B (280 a 320 nm) e UV-A (320 a 400 nm), componentes importantes da luz solar, se tornaram incapazes de germinar (ALVES et al., 1998; BRAGA et al., 2001a,b; FERNANDES et al., 2007).

A primeira descrição desse gênero ocorreu em 1879, na Ucrânia, por Metschnikoff, sendo denominado, primeiramente, como *Entomophora anisopliae* devido ao seu primeiro hospedeiro relatado, o besouro *Anisoplia austríaca*. Já no ano seguinte, em 1880, o nome da espécie é alterado pela primeira vez, passando a ser denominado *Isaria destructor*. O nome *Metarhizium* passa a ser usado em 1883, quando o russo Sorokin descreve o fungo como *Metarhizium anisopliae* (ROBERTS; ST. LEGER, 2004), denominando a infecção de muscardine verde, já que ao final do processo de infecção, há conidiogênese sobre os cadáveres apresentavam tons claros ou escuros de verde (ZIMMERMANN, 2007b), diferente de muscardine branca causada pelo fungo *B. bassiana*, que em processo semelhante recobre o inseto por conídios de coloração branca (ZIMMERMANN, 2007a). Uma errônea tradução do russo fez com que o gênero fosse denominado "*Metarrhizium*" com dupla grafia da letra "r"

até o ano de 1976, quando Tulloch propôs em uma detalhada revisão sobre o gênero a grafia atual, correta segundo o código internacional de nomenclatura.

Nessa mesma revisão, baseada em suas características morfológicas, Tulloch avaliou as 11 espécies e duas variedades (*M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *major*, *M. flavoviride*, *M. album*, *M. brunneum*, *M. cicadinum*, *M. gigas*, *M. chrysorrhoeum*, *M. glutinosum*, *M. leptophyei*, *M. truncatum* e *M. velutinum*) descritas até então por diversos autores, unificando-as em *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *major* e *M. flavoviride*. As outras espécies se juntaram às duas oficializadas ou realocadas para outros gêneros, sendo esse o primeiro grande estudo de revisão do gênero.

Nas décadas posteriores, diversos estudos revisaram e incluíram novas espécies e variedades nesse gênero, todos baseados em morfologia, composição dos micélios, e resistência a efeitos abióticos como temperatura e radiação (ROMBACH et al., 1986; GUO et al., 1986, YIP et al., 1992; RATH et al., 1995)

Driver et al. (2000) propuseram a primeira grande reclassificação molecular do gênero, baseados no sequenciamento da região ITS do rDNA fúngico, reconhecendo dez linhagens distintas, dividindo o gênero em três espécies: *M. album*, *M. anisopliae* e *M. flavoviride*, representando nove variedades, *M. flavoviride* tipo E, *M. flavoviride* var. *flavoviride*, *M. flavoviride* var. *minus*, *M. flavoviride* var. *novaezealandicum*, *M. flavoviride* var. *pemphigum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus*, *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *lepidiotum*.

Mais recentemente, Bischoff et al. (2009) elaboraram uma nova abordagem filogenética multigênica, a fim de avaliarem as relações moleculares dentro das espécies, variedades e isolados que classificaram como complexo *Metarhizium anisopliae*. A partir de evidências filogenéticas e morfológicas, os autores concluíram haver um caráter monofilético (de ancestral comum) de nove táxons terminais (que compõem esse complexo), reconhecendo como espécie: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus* e *M. brunneum*, antes variedades, e descrevendo duas novas espécies: *M. globosum* e *M. robertsii*. Os isolados ainda não classificados segundo a análise descrita por esses autores passaram a ter a denominação *M. anisopliae* sensu lato (s.l.), ou seja, pertencentes ao complexo *M. anisopliae*, porém sem espécie definida.

Durante muitos anos, o fungo *Metarhizium* só era conhecido por sua forma assexuada, porém, Liang et al. (1991) descrevem a forma teleomorfa, ou seja, sexuada, do gênero, relacionando *Cordyceps taii* como teleomorfo de *M. taii*, posteriormente descrito por Bischoff et al. (2009) como sinonímia de *M. guizhouense*). A transformação de forma assexuada para forma sexuada depende de diversos fatores ambientais e, como grande vantagem, permite uma maior variabilidade genética. Após essa descoberta, Liu et al. (2001) descreveram *C. brittlebankisoides* e identificaram como teleomorfo de *M. anisopliae* var. *majus* (LIU et al., 2002), posteriormente *M. majus*. Estudos moleculares feitos por Sung et al. (2007) transferiram a nomenclatura da forma de *Cordyceps* para *Metacordyceps*, por conta do nome da forma assexuada do fungo.

Controle biológico por entomopatogênicos

Relatos de doenças em artrópodes ocorrem desde o início da civilização. Os primeiros reportes científicos de micro-organismos infectando insetos datam do século XVIII. Réaumur em 1776 relatou a presença do fungo *Cordyceps* sp. infectando larvas de lepidópteros. Já em 1835, Bassi descobriu que um micróbio parasita, mais tarde nomeado como *Beauverian bassiana*, era causador muscardine branca, doença do bicho-da-seda, comprovando a natureza infecciosa de um agente microbiano (ZIMMERMANN, 2007a). Metchnikoff, em 1879, realizava os primeiros testes para controle microbiano do besouro *Anisoplia austriaca*,

utilizando conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* que causava uma doença conhecida como muscardine verde nos insetos (ZIMMERMANN, 2007b).

O termo controle biológico foi utilizado pela primeira por Smith (1919) para designar a introdução ou outro tipo de manipulação de inimigos naturais, com a finalidade de controlar a populações de pragas agrícolas (WILSON; HUFFAKER, 1976). Uma definição atual de controle biológico foi proposta por Eilenberg et al. (2001) como: “o uso de organismos vivos para suprimir a densidade populacional ou o impacto de organismos pragas, deixando-os menos abundantes ou menos nocivos do que, caso contrário, seriam”.

Segundo Eilenberg et al. (2009) existem três técnicas para a implantação do controle biológico em uma área: o controle biológico clássico, que consiste na introdução de uma espécie exótica em uma região afetada pela praga a ser controlada, sendo a forma mais comumente utilizada (ERTHAL JR, 2011); controle biológico aumentativo, que consiste em uma grande, tipo inundativo, ou pequena, tipo inoculativo, introdução de um inimigo natural que nem sempre se encontra em quantidade necessária para um controle eficaz durante todo o ano ou em uma época específica; e, por último, o controle biológico conservativo, que consiste em favorecer a população de inimigos naturais de uma área alterando o ambiente para isso.

A literatura traz um grande número de trabalhos sobre o controle microbiológico de artrópodes. Os estudos do uso desses bioagentes para pragas agrícolas são bem desenvolvidos, mas para controle de carrapatos ainda possui diversas lacunas (SAMISH et al., 2004). O uso de fungos e nematóides tem ganhado destaque como entomopatógenos com potencial acaricida. Parasitóides também demonstraram sucesso em programas inundativos (MWANGI et al., 1997); bactérias e vírus geneticamente recombinados também já foram estudados mas sem sucesso prático em programas de controle (SAMISH et al., 2004).

Dentre os micro-organismos utilizados para controle microbiano de artrópodes, os fungos entomopatogênicos são os mais estudados e apresentam ótimos resultados em estudos *in vitro* e a campo (SAMISH et al., 2004; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; FERNANDES et al., 2012).

Mais de 700 espécies, pertencentes a quase 90 gêneros, já foram descritas sendo patogênicas a artrópodes (SAMISH et al., 2004). As principais características, que fazem dos fungos excelentes alvos da pesquisa sobre controle de artrópodes, são a capacidade desses de penetrar ativamente pela cutícula do hospedeiro, a habilidade de agir de forma letal sobre diferentes formas do inseto ou ácaro e a relativa especificidade sobre um determinado artrópode, capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente, facilidade de produção do agente patogênico em condições laboratoriais, compatibilidade do entomopatógeno com inseticidas químicos; facilidade de aplicação, segurança em relação à poluição ambiental e à saúde de seres humanos e animais e efeito residual (ALVES, 1998). No entanto, também são relatadas desvantagens como ação letal lenta, necessidade de alta umidade para melhor eficiência, relativa susceptibilidade a radiação UV e efeito sobre invertebrados não alvos (ZIMMERMANN, 2007 a e b).

Metarhizium anisopliae s.l. foi o primeiro agente a ser reconhecido como potencial candidato ao controle biológico de pragas agrícolas, ainda em 1888 quando foi produzido e aspergido em massa no campo, na Rússia, busca do controle de *Cleonus punctiventris* (FARIA; WRAIGHT, 2007). No Brasil, diversas pragas agrícolas possuem importantes pesquisas para o uso a campo desse micopesticida, destacando-se o controle da cigarrinha-da-pastagem (*Deois flavopicta*, *Zulia entreriana*), cigarrinha-da-cana (*Mahanarva posticata*, *M. fimbriolata*), cupim-das-pastagens (*Cornitermes cumulans*), cupim da cana-de-açúcar (Gênero *Heterotermes*), broca-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*), broca-dos-citros (*Diploschema rotundicolle*), broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) e do percevejo-do-colmo do arroz (*Tibraca limbativentris*) (ALVES, 1998). Polar et al. (2008) relatam que *M. anisopliae* s.l.

apresenta mais de 200 espécies de hospedeiros, incluindo insetos e ácaros pertencentes a diversos gêneros

Estudos com carrapatos abrangem uma alta quantidade de Argasídeos e Ixodídeos. *Amblyomma maculatum*, *A. variegatum*, *A. americanum*, *A. cajenense*, *Argas persicus*, *Dermacentor nitens*, *Hyalomma anatolicum*, *I. scapularis*, *R. appendiculatus*, *R. microplus*, *R. sanguineus* (FERNANDES et al., 2012; KAYA; HASSAN, 2000; POURSEYED et al., 2010; SOUZA et al., 2009; SUN et al., 2011) e outros apresentaram bons resultados, demonstrando a possibilidade de controle biológico.

A infecção do carrapato via penetração ativa pela cutícula está relacionada a uma ação mecânico-enzimática (ARRUDA et al., 2005). Após entrar em contato com a cutícula dos artrópodes, os conídios desses fungos iniciam o processo de germinação e, então, há liberação de diversas enzimas, especialmente proteases, lipases e quitinases, que de forma conjunta com a pressão mecânica exercida pelo apressório (estrutura formada pela diferenciação do tubo germinativo) do fungo, consegue transpor o exoesqueleto íntegro do ectoparasito (SANTI et al., 2010; SANTI et al., 2010b; PERINOTTO et al., 2013). Esse mecanismo é comum a grande maioria dos fungos entomopatogênicos, porém há diferenças importantes entre alguns deles como no caso de *Nomuraea* sp (SRISUKCHAYAKUL et al., 2005; PERINOTTO et al., 2012) em que não há a formação do apressório. Esse processo de infecção pela cutícula é fundamental no sucesso do controle por fungos, pois, dessa forma, não é necessária a ingestão dos conídios fúngicos (como acontece com bactérias e vírus) para início do processo patogênico (ALVES, 1998), o que seria bastante dificultado em carrapatos. Após a penetração do fungo, inicia-se o processo de colonização dos órgãos internos do artrópode em que as hifas sofrem engrossamento, ramificam-se e diferenciam-se em blastosporos na hemocele do hospedeiro. Em insetos, toxinas liberadas pelos fungos, como a destruxina A por *M. anisopliae* s.l., são capazes de levar o artrópode a morte ao serem produzidas no interior do inseto infectado pelo fungo. Já em carrapatos, Golo et al. (2011) descreveram que essas toxinas não causam efeitos deletérios, quando aplicadas isoladamente, aos parâmetros biológicos das fêmeas, necessitando da ação mecânica e enzimática do fungo para levar o ácaro à morte. Após a morte e depleção dos nutrientes, os fungos são capazes de recolonizarem a cutícula, havendo produção de conídios e nova dispersão no ambiente.

Perinotto et al. (2012) descreveram que populações diferentes da mesma espécie de carrapato podem ter variação na susceptibilidade a um mesmo isolado fúngico. Isso demonstra mecanismo de seleção de cepas resistentes a esses fungos acontece naturalmente no ambiente, isso ocorre devido aos carrapatos viverem no solo durante a fase não parasitária, já tendo entrado em contato com conídios fúngicos.

Outra grande vantagem do uso de fungos entomopatogênicos é a possibilidade de sinergismo com bases químicas (BAHIENSE et al., 2006). Assim, pode-se atingir melhores resultados no controle, mesmo com menor uso de acaricidas químicos (e conseqüente menor impacto ambiental e sobre o animal infestado pelo carrapato).

Dentre os fungos mais estudados para controle microbiano de carrapatos, destacam-se *B. bassiana* e *M. anisopliae* s.l. (FERNANDES et al., 2011). Diversos estudos em laboratório demonstram ótimos resultados contra carrapatos (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; LEEMON; JONSSON, 2008). Já em trabalhos em condições de campo ou em estábulos, os resultados são bastante divergentes (POLAR et al., 2008; GARCIA et al., 2011). Outros fungos como *Lecanicillium lecanii*, *Isaria* sp., *Nomuraea* sp. etc. também já foram utilizados sobre carrapatos, sendo *L. lecanii* o que apresentou melhores resultados que o qualificam como um possível agente de controle (ANGELO et al., 2010). No Brasil, já foram encontrados isolados de *M. anisopliae* s.l. infectando naturalmente fêmeas de *R. Microplus*, demonstrando que essa interação ocorre naturalmente (COSTA et al., 2002).

A grande maioria dos estudos descritos na literatura foi realizada utilizando-se suspensão de conídios em solução de água destilada e Tween 80. Esse tipo de suspensão é muito eficaz em laboratório, apresentando, muitas vezes, ótimos resultados (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008). Porém, Polar et al. (2008), ao descreverem diversos trabalhos envolvendo tratamentos em condição de campo, relatam que apenas estudos com sucessivas e massivas aplicações de conídios foram capazes de levar a diminuição do número de carrapatos na área tratada, o que eleva bastante os custos dos programas de controle. Esses resultados demonstram que fatores ambientais como baixa umidade, radiação UV, temperatura alta etc. são altamente deletérios a esses fungos, resultando em diminuição significativa da sua patogenicidade. Dessa forma, formulações a base de óleo (KAAYA; HASSAN, 2000) ou gel polimerizado (SOUZA et al., 2009) são indicados a fim de proteger os conídios do ambiente.

Apesar da imensidade de trabalhos publicados sobre o uso de fungos sobre carrapatos, o comércio de produtos destinados a isso ainda é muito limitado. Pelo menos 12 espécies ou sub-espécies são empregadas como ingredientes ativos de micoInseticidas e micoacaricidas visando o controle de pragas, embora algumas não estejam atualmente disponíveis no mercado. Produtos a base de *B. bassiana* s.l. (34,1%), *M. anisopliae* s.l. (33,5%), *Isaria fumosorosea* (5,9%) ou *B. brongniartii* (4,1%) são os mais comuns dentre os 170 produtos desenvolvidos em escala global (FARIA; WRIGHT, 2007), desses produtos, apenas dois, comercializados nos E.U.A. são indicados diretamente a carrapatos pelo fabricante.

A proteína cinase ativada por AMP (AMPK)

Os primeiros relatos de cinases capazes de regular importantes enzimas do metabolismo de mamíferos datam de 1973, quando Beg et al. e Carlson & Kim descreveram enzimas, que em baixos índices de ATP, regulavam a atividade das enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase) e acetil CoA carboxilase (ACC) chaves no metabolismo lipídico (STEINBERG; KEMP, 2009), sugerindo que essa ativação ocorreria em função dos altos níveis de AMPc na célula. Anos mais tarde, Yeh et al. (1980) foram os primeiros a reconhecer o aumento dos níveis de AMP como ativador dessa cascata enzimática, apesar de não associarem isso a uma cinase. Só em 1987, Carling et al. foram os primeiros a provar que as enzimas descritas em 1973 eram na verdade uma só, capaz de modular as duas vias por fosforilação e descreveram, pela primeira vez, a cinase ativada por AMP (que começaria a ser chamada de AMPK por Munday et al. (1988)).

A AMPK (EC 2.7.11.31) é uma enzima heterotrimérica formada pelas subunidades α (catalítica), β e γ (regulatórias) (GOWANS; HARDIE, 2014; SANZ et al., 2013). Cada uma dessas pode ser formada por diferentes isoformas ($\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2$ e $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$), sendo todas as 12 combinações capazes de formar um complexo (HARDIE, 2003). Cada subunidade possui um gene codificador, porém alguns desses resíduos podem se alterar durante a expressão de éxons na transcrição do gene, levando a pequenas alterações da subunidade transcrita (STEINBERG; KEMP, 2009).

A ativação da AMPK ocorre em decorrência de uma mudança da carga energética celular, sinalizada pelo aumento nos níveis de AMP celular, com o conseqüente decréscimo dos níveis de ATP; especula-se que o nível de ADP também interfira nessa ativação (GOWANS; HARDIE, 2014). O equilíbrio [ATP]:[ADP] é de suma importância para uma célula se manter viável. Em períodos com alta disponibilidade de energia, o ADP é convertido em ATP com a adição de uma molécula de fosfato. Já em períodos de baixa energética, esse ATP é quebrado, liberando energia. Cabe a AMPK coordenar vias que levem a produção de ATP nessa condição de catabolismo (CARLING, 2004).

A subunidade α catalítica possui em sua estrutura domínios de serina /treonina na porção N-terminal que possuem alta atividade após serem fosforilados em um resíduo de treonina (conhecido como Thr¹⁷² devido à posição do aminoácido nesses domínios). A subunidade β , por sua vez, possui um importante papel conformacional da enzima (ligando a subunidade α a γ), além de ter funções regulatórias (SANZ et al., 2013). A ativação desses domínios é facilitada pelo aumento da relação AMP/ATP que alostericamente (por ligação à subunidade γ) força uma mudança conformacional na enzima, expondo o sítio de fosforilação (Thr¹⁷²) que sofrerá a ação de cinases regulatórias, denominadas AMPK cinases (AMPKK). (GOWANS; HARDIE, 2014). Essa ligação do AMP a AMPK não só facilita a ativação pelas AMPKK como também dificulta a ação das fosfatases que levariam ao fim da atividade da subunidade α (DAVIES et al., 1995).

A principal enzima responsável pela fosforilação e, conseqüente, ativação da AMPK é uma cinase B1 do fígado do complexo supressor tumoral (LKB1), também conhecido como STK11 (serina/treonina cinase 11) (SHACKELFORD; SHAW, 2009), porém, as CaMKKs (proteínas cinase cinases ativadas por Ca²⁺/calmodulina), especialmente a CaMKK β , podem desempenhar um papel fundamental na cascata de ativação dessa enzima após estímulos decorrentes da baixa energética (GOWANS; HARDIE, 2014) (Figura 1).

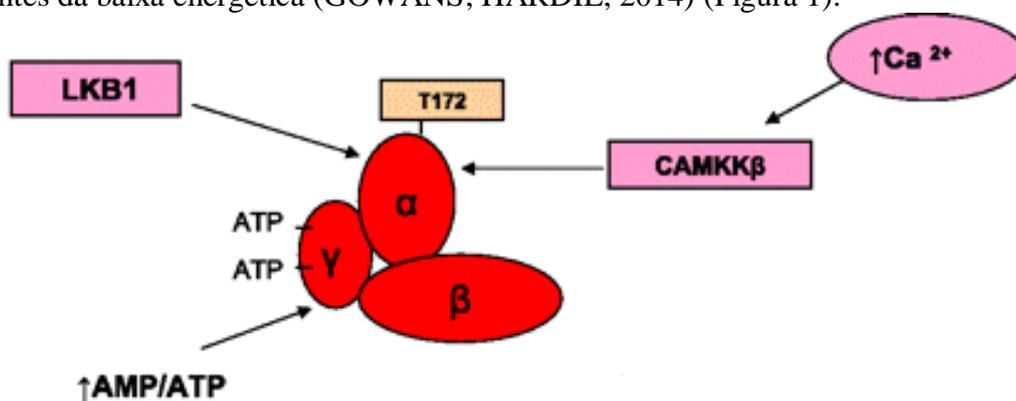


Figura 1. Esquema de ativação da proteína AMPK e suas regulações. Adaptado de RUDERMAN et al. (2010)

Já a inibição pode ser alostérica, por aumento das concentrações de ATP, em detrimento da de AMP na célula, além disso, na subunidade β da AMPK presente no músculo possui sítios de ligação com glicogênio que, provavelmente, é capaz de inibir a atividade dessa enzima (HARDIE, 2011). A inibição pode ocorrer, também, por ação enzimática pela defosforilação do resíduo Thr¹⁷² sendo mediada pelas proteínas-fosfatases 2A e 2C (PP2A e PP2C) (DAVIES et al., 1995; PARK et al., 2013). Outra via inibitória importante envolve uma cascata de ativação de PKA, por aumento dos níveis de AMPc (GOWANS; HARDIE, 2014). Após ativada, a PKA é capaz de diminuir a AMPK indiretamente, por modular negativamente a atividade da CaMKK β , e diretamente, fosforilando os resíduos 485 e 491 de serina (nas subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$, respectivamente) (HURLEY et al., 2006).

Diversos ativadores farmacológicos estão descritos na literatura, entre eles pode-se citar: oligomicina, sorbitol, resveratrol, metformina, fenobarbital, 5-aminoimidazol-4-carboxamido ribosídeo (AICAR) etc. A grande maioria desses ativadores, ainda, não possuem seu mecanismo de ação totalmente descrito, apesar de quase todos envolverem ativação alostérica (STEINBERG; KEMP, 2009; HAWLEY et al., 2010). O mais estudado dentre esses é o AICAR, que, ao entrar na célula sofre uma série de modificações se transformando em ZMP, um mimético do AMP, dessa forma se tornando apto a ligar e ativar a subunidade γ da AMPK (HAWLEY et al., 2010).. Por outro lado, não há inibidores farmacológicos específicos para AMPK; o Composto C, uma pirrazolopirimida que é capaz de atuar como

antagonista do ATP que inibiria a enzima, foi durante anos usado como inibidor, mas hoje sabe-se que essa molécula além de também inibir outras vias sem ligação a AMPK, também não é capaz de inibir essa via em todas as situações metabólicas (VIOLLET et al., 2010).

A atuação da AMPK está ligada à expressão gênica e ativação direta sobre o metabolismo da glicose, de lipídios e sobre síntese proteica. De uma maneira geral, seus efeitos são desligar as vias metabólicas que consomem ATP (vias anabólicas) e, ao mesmo tempo, estimular vias de produção de ATP (catabólicas) com o objetivo de manter a homeostase energética na célula (GOWANS; HARDIE, 2014).

Como a dissertação abordará apenas a vertente lipídica, na revisão de literatura será focada nesse ramo metabólico dessa enzima.

O primeiro efeito da AMPK no metabolismo lipídico está na obtenção desses lipídios, em estado de privação energética. É especulado que as enzimas ácido graxo translocase (FAT/CD36) e proteína ligadora de ácido graxo (FABP) sejam estimuladas pela AMPK a aumentar a entrada de lipídios pela membrana da célula (LIUKEN et al., 2003; BONEN et al., 2007). Long et al. (2005) demonstraram que ratos knockout para a fração $\gamma 3$ da AMPK não sofrem o aumento da atividade de FAT/CD36 em baixa energética, sugerindo ainda mais que essa relação exista de forma direta.

A ativação de AMPK está fortemente associada com a fosforilação e inativação da enzima ácido graxo carboxilase (ACC) (STEINBERG; KEMP, 2009). Com essa inativação, não há conversão de acetil CoA em malonil CoA, portanto não havendo inibição competitiva da canitina acil transferase, levando a predominância da beta-oxidação sobre a síntese de ácido graxos.

Um ponto chave para a síntese de triglicerídios é a conversão de glicerol-3-fosfato em ácido lisofosfatídico sendo comandada pela enzima glicerol-3-fosfato acil transferase (GPAT) (STEINBERG; KEMP, 2009). Em tecidos ricos em lipídios, a ativação de AMPK leva a inibição da atividade dessa enzima, porém, o mecanismo de inibição não é totalmente conhecido, sendo especulado a atuação de uma outra molécula nessa interação, já que não há descrição de fosforilação direta de AMPK sobre GPAT (MUOIO et al., 1999).

Outra via importante que também é inibida por ação da AMPK é a de síntese de colesterol. Ao fosforilar a enzima HMGCoa redutase no resíduo Ser182 (em humanos), há inibição da atividade catalítica dessa enzima (STEINBERG; KEMP, 2009). Esse processo, provavelmente, está relacionado à ativação da AMPK por ação hormonal de adiponectina (YAMAUCHI et al, 2002).

Além da ação direta sobre vias de produção de lipídios, a AMPK é capaz de atuar em longo prazo sobre essas vias, diminuindo a expressão de genes lipogênicos (como FAS, S14, L -PK e SREBP-1) (STEINBERG; KEMP, 2009).

Em contrapartida, a AMPK possui ação inibidora sobre a lipase-hormônio sensível (HSL), uma das enzimas responsáveis pela lipólise atuando sobre a quebra de triacilglicerol em ácidos graxos livres e na liberação dessas moléculas pelos adipócitos (SULLIVAN et al. 1994; DAVAL et al., 2005). Ou seja, curiosamente a AMPK é capaz de inibir a produção e, ao mesmo tempo, regular a quebra e liberação de novas moléculas de ácido graxo em determinadas células. Uma possível explicação para esse fato é dada por Daval et al. (2005) que especula que essa ação regulatória seja um feedback para os níveis de ácido graxo do indivíduo, evitando altas concentrações livres que poderia ter uma ação tóxica.

Proteína cinase ativada por estímulo extracelular (ERK)

Proteínas cinase ativadas por estímulo extracelular (ERK) são serina/treonina cinases pertencentes à superfamília das MAPK (proteínas cinase ativadas por mitógenos), juntamente

com as vias SAPK/JNK (proteína cinase ativada por estresse/c-jun cinase) e a via da cinase p38.

A ativação da via ERK, de uma forma geral, por receptores do tipo tirosina cinase (como na via da insulina), por integrinas (associados a fatores de crescimento) ou por canais iônicos de cálcio (ligados à ativação de proteínas cinases c (PKC)) (YEE et al., 2008; ROSKOSKI JR, 2012).

A cascata de ativação da ERK se inicia com a ativação desses receptores/canais de membranas por mitógenos. Esse mecanismo leva ao recrutamento e ligação com outras proteínas importantes (como Sos, PLC γ , GRB2, Shc) para a ativação da enzima Ras ligada a GTP (GTP-Ras) na membrana plásmática ou em organelas específicas (WORTZEL;SEGER, 2011). Outra forma de ativação da Ras é por via direta da PKC, induzida pela abertura dos canais de cálcio. O próximo passo da via é o recrutamento das enzimas Rafs (Raf-1, A-Raf, B-Raf) (também chamado de MAP cinase cinase cinase ou MAP3K), sendo fosforilada diretamente pela GTP-Ras (que se transforma em GDP-Ras) ou por meio da via de fosfatidil-inositol 3-fosfato cinase (PI3K) (WORTZEL;SEGER, 2011; ROSKOSKI JR, 2012).

Após ativada, as Rafs seguem a cascata de ativação ao fosforilarem as enzimas MEK1 e 2 (também chamadas de MAP cinases cinases ou MAPKK) em resíduos típicos Ser-Xaa-Ala-Xaa-Ser/Thr presentes nessas enzimas. As MEK 1/2 são enzimas de 45 e 46 kDa (respectivamente), sendo as primeiras descritas como ativadoras da ERK; são formadas por um grande domínio N-terminal e um pequeno domínio catalítico C-terminal. A porção catalítica é capaz de fosforilar resíduos regulatórios de treonina e serina na ERK. Os únicos alvos conhecidos para essa enzima são ERK1/2, o que sugere que essas enzimas sejam, realmente, específicos moduladores dessa via (WORTZEL; SEGER, 2011). Porém, em neurônios e glia de Müller, a ativação de ERK ocorre por uma via resistente à inibição da MEK (KINKL et al., 2001), além disso, em culturas de fibroblastos, metabólitos de óxido nítrico são capazes de promover a ativação de ERK a partir de um mecanismo envolvendo PKC e não MEK (BAPAT et al., 2001).

O último passo da via é a própria ERK. Duas isoformas bem conservadas ERK 1 (44-kDa) e ERK 2 (42-kDa) são ativadas, principalmente, pelas MEKs em resíduos treonina e tirosina, como já descrito anteriormente (Figura 2). São cinases bastantes semelhantes, tendo os mesmos alvos de ação. São cinases Pro-direcionadas, ou seja, fosforilam resíduos treonina ou serina localizados próximos a resíduos de prolina de suas proteínas alvo (GONZALEZ et al., 1991).

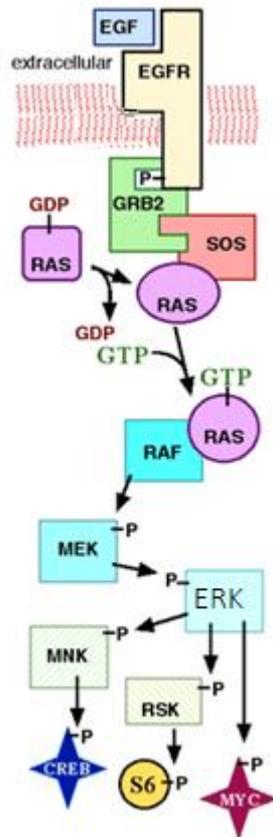


Figura 2. Esquema da via de ativação da enzima ERK, também chamada de via Ras-Raf-MEK-ERK pela sequência de enzimas pertencentes a essa via. Retirado de <http://en.wikipedia.org/wiki/File:MAPKpathway.png>

São descritos cerca de 200 diferentes alvos para ERKs, sendo cascatas de ativações importantes para a célula (como vias do metabolismo lipídico, glicídico e proteico), constituintes de citoesqueleto e alvos nucleares. Estima-se que, uma vez ativada, ERKs sejam capazes de, após um curto período, fosforilar mais de 500 alvos celulares (WORTZEL;SEGER, 2011).

Mais uma vez, será dado enfoque às vias do metabolismo lipídico envolvidas com essa enzima. Greenberg et al. (2001) demonstraram que ERK é capaz de fosforilar HSL, desta forma aumentando sua atividade catalítica, ou seja, levando a quebra e saída de triacilglicerol nos adipócitos formando ácidos graxos livres dos adipócitos; além disso, outra ação de ERK 1/2 é promover o *downregulation* do ARNm de perilipina, molécula importante para a entrada de triacilglicerol nas gotículas lipídicas dos adipócitos (RYDEN et al., 2004). Outra atuação no metabolismo lipídico é sobre os fatores de transcrição SREBP1/2 (elementos reguladores de esterol ligados a proteína), que atuam diretamente sobre a síntese de colesterol; porém, não é totalmente conhecida a atividade da ERK sobre essa via (GEHART et al., 2011). Além disso, ERK1/2 têm um papel relevante na diferenciação de adipócitos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização do Experimento

O estudo foi realizado no Laboratório de Controle Microbiano da Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no município de Seropédica-RJ e no Laboratório de Sinalização Celular, no Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal do Rio de Janeiro, localizado no município do Rio de Janeiro – RJ.

3.2 Manutenção das colônias de *Metarhizium anisopliae* sensu lato(s.l.)

Os isolados de *M. anisopliae* s.l. utilizados no experimento foram CG 32, CG 112, CG 148, CG 347 e CG 629 (Tabela 1). Para a manutenção das colônias, os fungos foram inoculados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido de extrato de levedura a 1%. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara climatizada, tipo B.O.D., a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa (U.R.) $\geq 80\%$ durante 15 dias para o crescimento fúngico e produção de conídios. Posteriormente, foram armazenadas a 4°C até a realização do bioensaio.

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. com seus respectivos hospedeiros ou substrato e origens.

| Isolado | Hospedeiro/Substrato | Local |
|---------|----------------------------------------------------|----------------------|
| CG 32 | <i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae) | Bahia |
| CG 112 | <i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae) | Planaltina - DF |
| CG 148 | <i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae) | Goiânia - GO |
| CG 347 | Solo | Minaçu - GO |
| CG 629 | <i>Mahanarva posticata</i> (Homoptera: Cercopidae) | Marechal Deodoro- AL |

CG=isolados provenientes da Coleção de fungos de invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

3.3 Obtenção das suspensões de *M. anisopliae* s.l.

Os conídios foram raspados das superfícies das placas e ressuspensos em água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80 a 0,1% (LUZ et al. 1998). A suspensão foi quantificada segundo Alves (1998) utilizando câmara de Neubauer e microscópio óptico até atingir-se a concentração de 10^8 conídios/mL. Foram inoculados 10 μL da suspensão inicial em meio de cultura BDA para avaliação da viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* s.l. (ALVES, 1998). Partes das suspensões foram separadas e autoclavadas a fim de inativar a germinação fúngica.

3.4 Viabilidade dos conídios

Uma amostra de 10 μL da suspensão de cada isolado, autoclavado ou não, foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubada em câmara climatizada sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ durante 24 horas. A leitura da viabilidade dos conídios foi feita através de observação direta ao microscópio óptico e o cálculo da germinação dos mesmos foi realizado segundo Alves (1998).

3.5 Obtenção da colônia de *Rhipicephalus microplus*

Fêmeas ingurgitadas foram obtidas de infestação artificial de três bezerros mestiços estabelecidos (submetido à Comissão de Ética da UFRRJ, protocolo 2083.011620/2011-68) da EPPWON, em estábulo situado em Seropédica - RJ, entre os paralelos 22°49' e 22°45' de latitude sul, e os meridianos 43°38' e 43°42' de longitude oeste de Greenwich, com altitude de 33 metros e clima subtropical.

Após cerca de 21 dias de infestação, as fêmeas totalmente ingurgitadas foram coletadas do solo das baias, levadas ao laboratório, lavadas em água corrente e foi realizada a assepsia da cutícula utilizando hipoclorito de sódio a 1%.

3.6 Tratamento das fêmeas por inoculação

No tratamento por inoculação, as fêmeas foram divididas em 14 grupos, com dez fêmeas cada. O peso dos grupos foi padronizado. Os grupos tratados seguem descritos na Tabela 2. Para os grupos tratados, foram inoculados nas fêmeas, cinco µL de suspensão fúngica viável ou autoclavada através do método de inoculação escolhido foi o descrito por Johns et al. (1998), que utiliza o forame entre o capítulo e a base do escudo para as aplicações. As suspensões apresentavam as concentrações de 10⁸ conídios/mL.

Após os tratamentos as fêmeas foram dispostas em placas de Petri e acondicionadas em câmaras climatizadas (UR ≥ 80% e T 27 ± 1°C) até o momento da coleta do corpo gorduroso.

Tabela 2. Identificação dos grupos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* estabelecidos nos tratamentos utilizando diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l.

| Siglas | Descrição dos grupos |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CTR 24 e CTR 48 | Grupo controle de fêmeas ingurgitadas que não recebeu qualquer tratamento. Coletas realizadas 24 horas (h) e 48h após o tratamento. |
| H2O 24 e H2O 48 | Grupo controle de fêmeas ingurgitadas inoculadas com água destilada estéril e Tween 80 0,01%. Coletas realizadas 24h e 48h após o tratamento. |
| CG 32 A, CG 112 A, CG 148 A, CG 347 A e CG 629 A | Grupo de fêmeas ingurgitadas tratadas por inoculação de suspensão conidial autoclavada (promovendo a inativação dos conídios) do respectivo isolado de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. Coletas realizadas 24h e 48h após o tratamento. |
| CG 32 V, CG 112 V, CG 148 V, CG 347 V, e CG 629 V | Grupo de fêmeas ingurgitadas tratadas por inoculação de suspensão conidial viável do respectivo isolado de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. Coletas realizadas 24h e 48h após o tratamento. |

3.7 Coleta de Corpo Gorduroso periférico

A coleta dos corpos gordurosos periféricos ocorreu 24 e 48h depois do tratamento.

A coleta do CG do carrapato foi realizada em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Foi realizado um corte na extremidade anterior das fêmeas permitindo o esgotamento total das vísceras, sem pressionar para que não houvesse a retirada do corpo gorduroso.

Após isso, o exoesqueleto de quitina foi aberto de forma antero-antero lateral oposta, separando cutícula dorsal da parede ventral, permitindo acesso ao corpo gorduroso periférico que fica aderido a essa cutícula. O corpo gorduroso foi raspado com o auxílio de agulhas.

O material coletado das 10 fêmeas pertencentes a cada grupo era coletado, deixando escorrer o excesso de PBS e mantido em N₂ líquido em tubos criogênicos.

3.8 Análise de Proteínas

3.8.1 Extração de Proteínas

As amostras após serem retiradas do congelamento, foram ressuspensas em 100 µL de tampão de homogeneização de tecidos para blotting (Triton^{x100} 0,1%; EDTA 10mM; coquetel inibidor de protease SIGMA 1x; PMSF 1mM; NaF 1mM; PAO 1mM; azida sódica 0,2mg/mL; Tris-HCl pH 7,4 20 mM; H₂O Milli-Q).

Após a homogeneização, as amostras foram congeladas por cinco minutos em nitrogênio líquido, permanecendo mais cinco minutos em temperatura ambiente até levar ao sonicador onde ficou por 10 minutos para que houvesse rompimento celular e exposição das proteínas.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13000 g a 4°C por 15 minutos. Após isso, coletou-se o sobrenadante para posterior processamento.

3.8.2 Dosagem de Proteína

O conteúdo protéico foi quantificado através do método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Em triplicata, um microlitro de amostra foi colocado em poços de placa com 96 poços com 39 µL de água Milli-Q estéril. Albumina sérica bovina foi utilizada em diferentes concentrações como padrão.

Para obter o valor da concentração de proteínas nas amostras estudadas estabeleceu-se uma relação entre as absorbâncias dessas amostras com as de diferentes concentrações do padrão albumino-sérico.

3.9 Análise do Perfil Lipídico

3.9.1 Extração dos Lipídios

Os lipídios foram extraídos utilizando o método de Bligh & Dyer (1959), de forma rápida, onde foi utilizado 300µg de proteína acrescidos de quatro mililitros de uma mistura de metanol: clorofórmio: água (2: 1: 0,8 v/v) em tubos cônicos apropriados. Após agitação intermitente, de cinco em cinco minutos, durante uma hora, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3.000 rpm em uma centrífuga clínica e o sobrenadante contendo os lipídios, separado do precipitado.

Aos sobrenadantes foram adicionados dois mililitros de água destilada e um mililitro de clorofórmio para separação das duas fases: *Orgânica* (Inferior) e *Aquosa* (Superior). Após agitação, o material foi novamente centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm. A fase orgânica,

contendo os lipídios, foi então separada em novos tubos. A secagem da fase orgânica foi feita por arraste utilizando o gás nitrogênio (N₂).

3.9.2 *Corrida Unidimensional*

A técnica utilizada foi a de Cromatografia em Camada Fina (Thin Layer Chromatography - TLC) em placas de sílica e alumínio. A fase orgânica, que anteriormente havia sido seca por arraste pelo N₂, foi ressuspensa em 30 µL de clorofórmio e, em seguida, levadas ao vórtex. As amostras foram aplicadas na sílica em espaços de 1 cm cada, conforme os dias de tratamento.

Posteriormente, foram introduzidas em câmara saturada previamente preparada – o preparo da câmara de corrida consistiu em dispor o solvente sobre o fundo da mesma e a criação de um microambiente saturado, com o auxílio de papéis de filtro, por durante 1 hora.

Para a análise unidimensional dos lipídios neutros presentes, foram usados 88 mL de solvente que apresentava os seguintes constituintes: de hexano: éter etílico: ácido acético (60:40:1, v/v) (KAWOOYA; LAW, 1988)

3.9.3 *Revelação das placas*

A revelação dos lipídios foi feita segundo Ruiz & Ochoa (1997), através da aspersão de solução Cherring, composta de sulfato de cobre 10% (p/v), ácido fosfórico 8% (v/v) e água Milli-Q. A secagem da mesma foi feita com uso de secador.

As placas secas foram dispostas em placas de vidro e levadas ao forno Pasteur (170° C) entre 5-10 minutos, até que os lipídios fossem queimados, evidenciando assim as bandas.

As imagens foram obtidas através do escaneamento digital das placas prontas e a análise das bandas foi feita pelo programa *ImageMaster TotalLab v1.11*[©].

3.10 **Gel de Eletroforese (SDS-Page)**

3.10.1 *Preparo das amostras*

Foram aliqüotadas, em microtubos *Eppendorf*[®], na proporção 6:1 (v/v), o correspondente a 30 µg de proteína da amostra junto à solução de tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 10%; 20% glicerol; β-mercaptoetanol; azul de bromofenol 0,05% e água Milli-Q) no volume que o tornasse diluído seis vezes. Com esta etapa, foi realizada a primeira fase desnaturante (desnaturação química).

Após essa etapa, realizou-se a imersão do material em água fervente por 3 minutos, correspondendo à segunda fase desnaturante (desnaturação física).

Posteriormente, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e armazenadas em gelo até a aplicação nos géis de eletroforese.

3.10.2 *Preparo dos Géis de Eletroforese*

O preparo dos géis SDS-PAGE 10% seguiu o protocolo descrito por Laemmli (1970). O sistema utilizado foi o vertical descontínuo, composto de dois géis (gel de Empacotamento 10%, e gel de separação 4%, responsável pela separação das proteínas desnaturadas segundo sua carga exposta).

3.10.3 Eletroforese

Após a polimerização dos géis, as placas com os géis foram acopladas a cuba de corrida. Essas foram cobertas por tampão de corrida (Tris-HCl pH 8,3 25 mM ; glicina 250 mM; SDS 0,1%; Água Milli-Q).

As amostras e o padrão de peso molecular foram aplicados nos poços. 30 µg de proteína de cada amostra foram utilizadas e marcador de peso molecular (Spectra™ Multicolor BroadRange Protein Ladder SM1841).

Durante a corrida, no gel de empacotamento a amperagem permaneceu constante em 20 mA, até ocorrido o total empacotamento de todas as amostras. Atingido o Gel de Separação, a amperagem foi modificada para 35 mA, também mantida constante até o fim da corrida.

3.11 Western Blotting

Após SDS-PAGE, as proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas eletroforéticamente (SemiDry, Bio-Rad) para uma membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore), empregando-se 15 mA por 45 min, utilizando o tampão de transferência (glicina 390 mM; Tris 480 mM e água Milli-Q).

Após o término da transferência, as membranas de PVDF foram coradas com Ponceau S 0,2% para verificação do sucesso dessa etapa. Após isso, a membrana foi lavada com solução TBS-T (Tris-HCl pH 7,5 2 mM; NaCl 50 mM; Tween 20 0,1%) até que estivesse livre de tampão de corrida e Ponceau. A membrana foi então bloqueada com 5% (p/v) de albumina (dissolvido em TBS-T) por 24 h. Após este período, a membrana foi incubada por duas horas com anticorpo p-Tyr (PY99- SC-7020), anticorpo monoclonal IgG_{2b} de camundongos que detecta especificamente resíduos de tirosina fosforilados, diluído 1:10000 em tampão de anticorpos (albumina 5% (p/v) em TBS-T), p-Ser (AB-1603), anticorpo policlonal de coelhos que detecta especificamente resíduos de serina fosforilados, diluído 1:1000, p-ERK (SC-7383), anticorpo monoclonal IgG_{2a} de camundongos que detecta especificamente a enzima ERK ativada, diluído 1:1000 e p-AMPK (SC-33524), anticorpo policlonal IgG de coelhos que detecta especificamente a enzima AMPK fosforilada, diluído 1:1000. A membrana foi então lavada três vezes com TBS-T por 10 min e incubada por duas horas com anticorpo secundário anticamundongo conjugado com peroxidase. A revelação foi conduzida com o sistema ECL (Amersham Biosciences/GE Healthcare) de detecção, em que colocamos as soluções que ao serem degradadas pela peroxidase do anticorpo secundário emitem luminescência em câmara escura. A membrana é revelada em filme radiográfico exposto à membrana por 10 minutos.

O mesmo procedimento foi repetido com anticorpo primário anti-tubulina, servindo de normalização para o experimento (uma proteína constituinte de citoesqueleto que todos os grupos apresentam na mesma proporção). Para isso, realizou-se o *strip* do blot com NaOH 1 M, para retirada de todo anticorpo ligado a membrana e limpeza com TBS-T por 10 minutos por três vezes.

A intensidade de coloração das bandas foi comparada com o auxílio do software *ImageMaster TotalLab v1. 11*®.

3.12 Análise estatística

Foram realizadas, pelo menos, três repetições para cada experimento. Para cada repetição, os grupos eram formados por 10 fêmeas totalmente ingurgitadas.

Para análise dos dados foi realizada análise de variância seguida pelo teste de Tukey para comparação entre as médias em um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) com o uso do programa *Graphpad Prism*® v5.0. Os grupos foram comparados em cada tempo de coleta.

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade dos conídios

A viabilidade dos conídios dos isolados de *M. anisopliae* s.l. estudados foi de 100% de germinação, nos grupos que não passaram por autoclavação. Já nos grupos autoclavados, a germinação foi 0% após 24 horas de incubação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$, demonstrando eficácia no processo de inativação física da germinação fúngica por autoclavação.

4.2 Análise do perfil lipídico

No período de 24 horas, apenas três isolados de *M. anisopliae* (CG 32, CG 112 e CG 148) foram capazes de elevar a concentração de triacilglicerol (TAG) nos corpos gordurosos estudados, todos em cerca de duas vezes a quantidade encontrada no controle (2,1, 52,3 e 2,6 vezes, respectivamente). Além disso, os isolados CG 32 e CG 112, quando autoclavados, levaram a queda na concentração de colesterol (CHO), em aproximadamente metade da concentração encontrada no controle, e de ácidos graxos livres (apenas no CG 32 autoclavado, com redução de 125% quando comparado ao controle). Os outros isolados não citados anteriormente não foram capazes de alterar. Não foi possível avaliar colesterol esterificado em nenhuma das amostras devido a um problema de arraste que inviabilizou a densitometria em todas as repetições realizadas (Figuras 3 e 4).

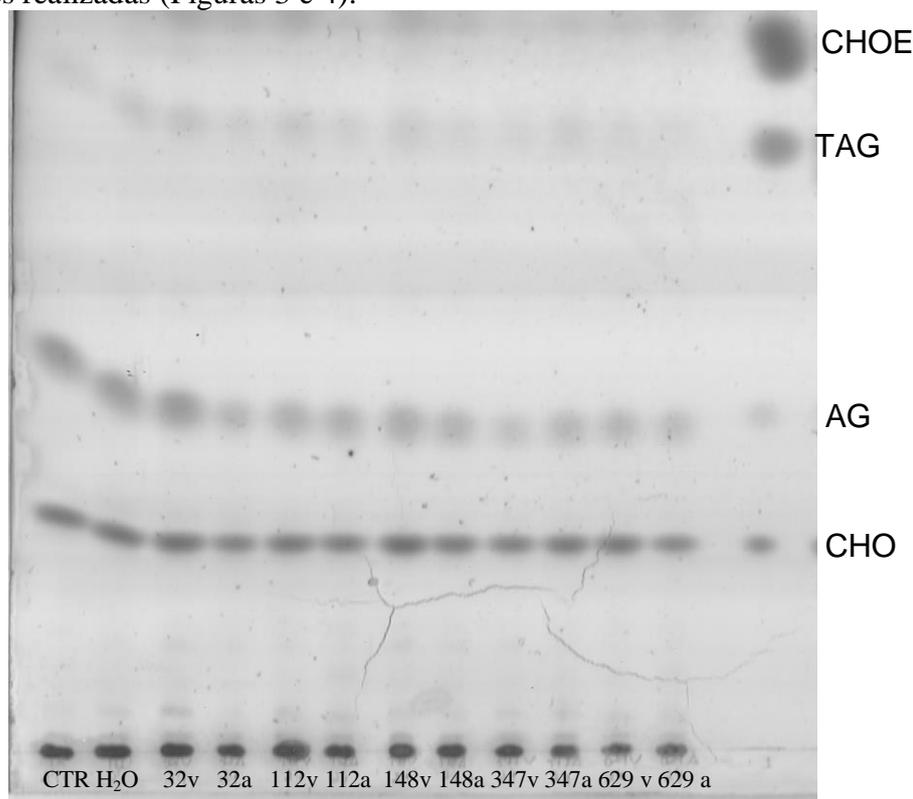


Figura 3. Composição de lipídeos neutros nos trofócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por inoculação de suspensão conidial de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. coletados 24 horas após o tratamento. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à densitometria pelo programa ImageMaster TotalLab. Cada grupo continha 10 fêmeas. CHOE: Colesterol esterificado; TAG: Triacilglicerol; AG: Ácido graxo livre; CHO: Colesterol.

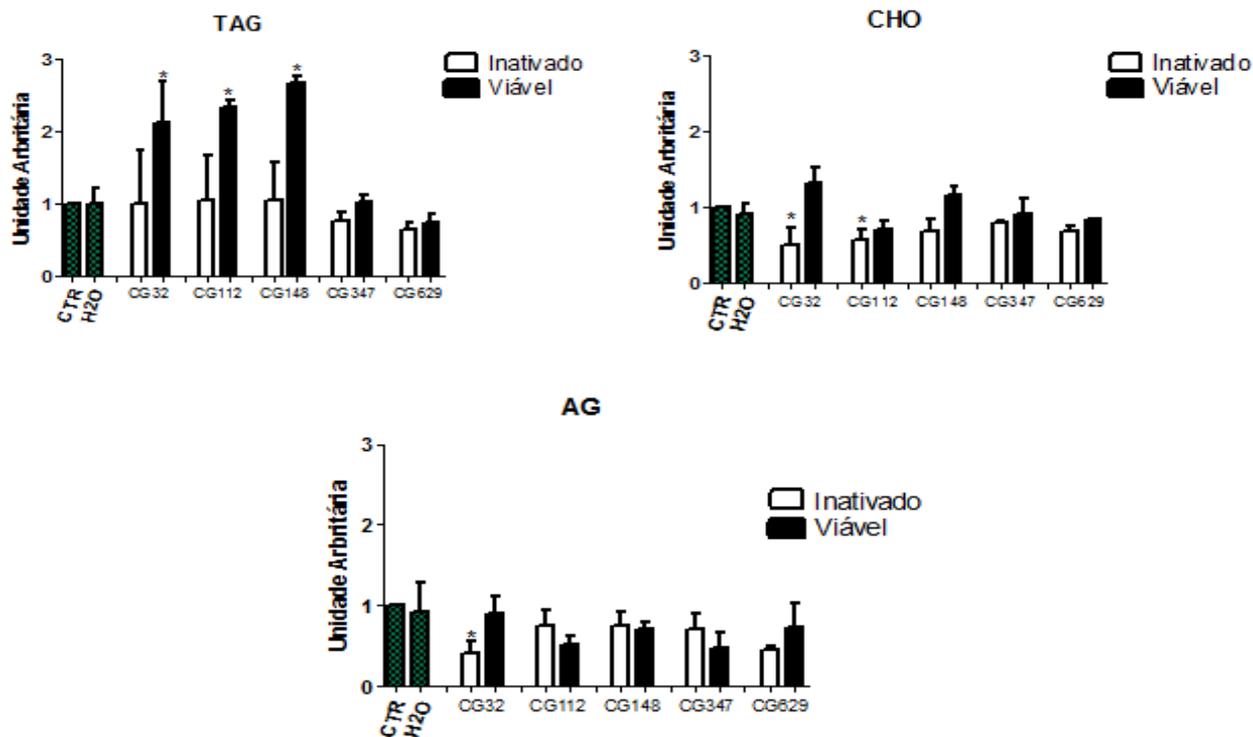


Figura 4. Percentual de triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* no período de 24 horas após o tratamento inoculação de suspensão conidial de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. viáveis e inativados. Valores obtidos a partir da análise densitométrica utilizando o programa Image Master Totallab. As barras representam a média \pm o erro padrão e os asteriscos representam diferença estatística a 5% de significância comparado ao controle segundo o teste de Tukey.

Já no período de 48 horas após o tratamento, todos os isolados quando viáveis levaram a um aumento das concentrações de TAG e AG nos trofócitos de *R. microplus*. O aumento de TAG foi de 2,9 vezes para CG 32, 10,1 vezes para CG 112, 5,9 vezes para CG 148, 4,41 vezes para CG 347 e 5,3 vezes para CG 629. Para as concentrações de AG, o aumento foi de aproximadamente duas vezes para todos os isolados quando comparados ao controle. O isolado CG 112 foi capaz de elevar os níveis de AG mesmo após autoclavados, também por cerca de duas vezes. A quantidade de colesterol não apresentou diferença estatística em relação ao controle para nenhum dos grupos tratados. Os níveis de colesterol esterificado não foram avaliados devido a problemas na densitometria, como já havia ocorrido na análise de 24 horas (Figuras 5 e 6).

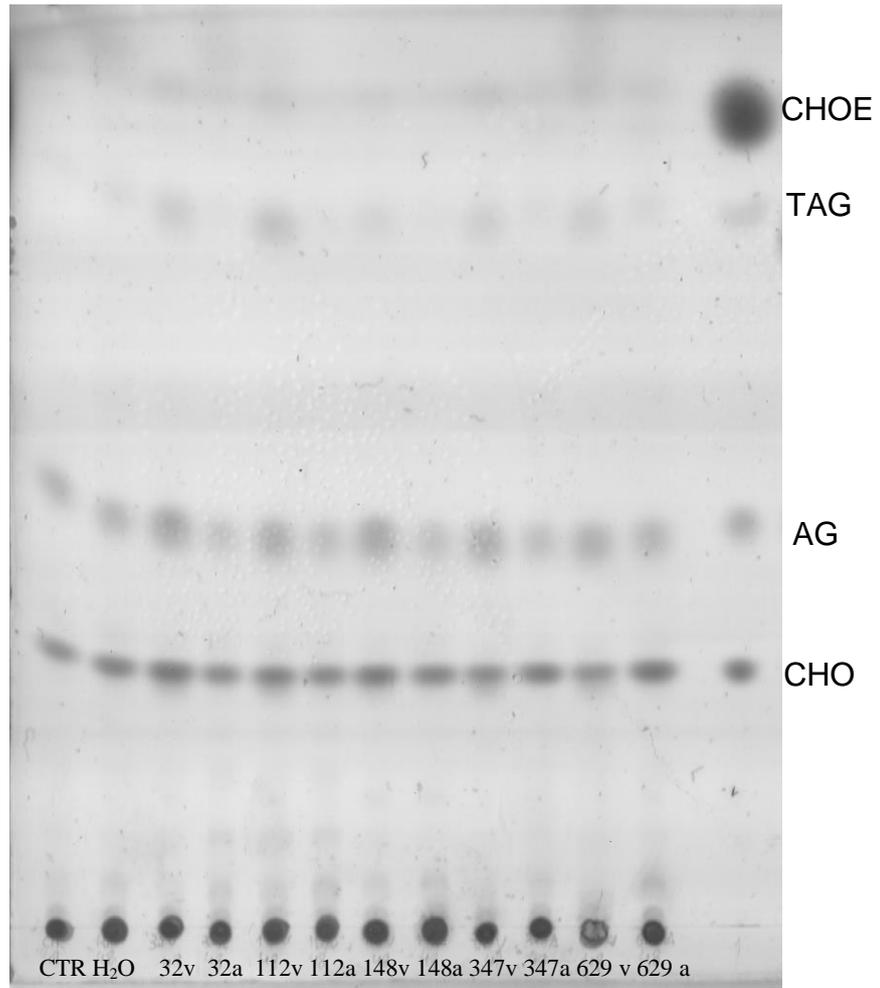


Figura 5. Composição de lipídeos neutros nos trofócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por inoculação de suspensão conidial de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. coletados 48 horas após o tratamento. A placa de sílica de cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à densitometria pelo programa ImageMaster TotalLab. Cada grupo continha 10 fêmeas. CHO: Colesterol esterificado; TAG: Triacilglicerol; AG: Ácido graxo livre; CHO: Colesterol.

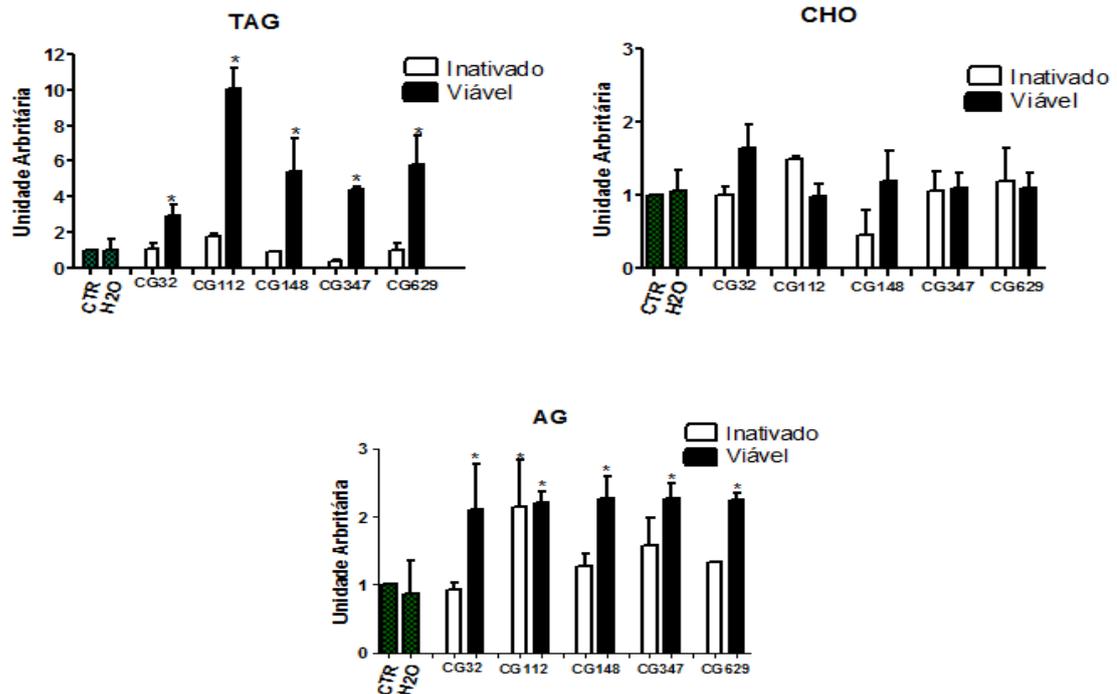


Figura 6. Percentual de triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* no período de 48 horas após o tratamento inoculação de suspensão conidial de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. viáveis e inativados. Valores obtidos a partir da análise densitométrica utilizando o programa Image Master Totallab. As barras representam a média \pm o erro padrão e os asteriscos representam diferença estatística a 5% de significância comparado ao controle segundo o teste de Tukey.

4.3 Modulação de vias metabólicas

4.3.1 p-Tyr

Para melhor compreensão das possíveis alterações metabólicas existentes no carrapato infectado por fungos entomopatogênicos, optou-se por realizar experimentos que avaliassem mudanças no perfil de modulação enzimática das células, começando pelo *Western blotting* a fim de demonstrar o perfil de fosforilação no resíduo tirosina das proteínas das células avaliadas. No período de 24 horas (Figura 7), pode-se observar, claramente, a evidenciação de uma banda de peso molecular entre 140 e 260 KDa e duas bandas com peso molecular entre 35 e 40 KDa. Na banda entre 140-260 KDa, observa-se que os corpos gordurosos infectados pelos isolados CG 148 e CG 347 na forma viável encontram-se mais fosforilados. A infecção pelo isolado CG 347 também levou maior fosforilação das bandas entre 35-40 KDa, tanto na forma viável quanto inativada.

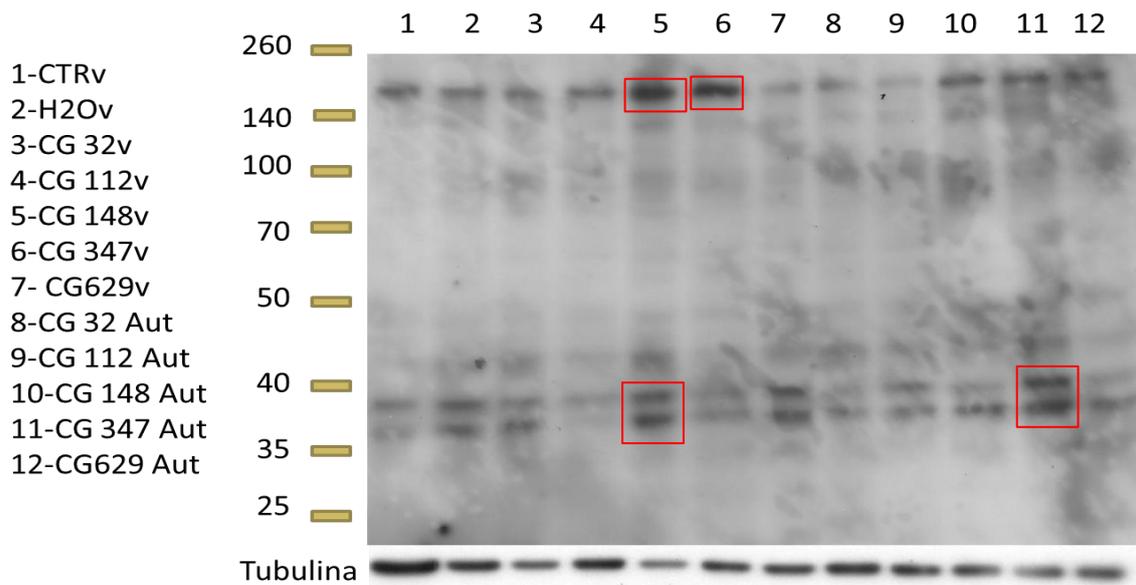


Figura 7. Perfil de fosforilação em tirosina em células de corpo gorduroso de *Rhipicephalus microplus* após 24 horas de tratamento com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra pTyr (PY99 SC 7020) e reveladas em kit ECL.

No período de 48 horas após a infecção (Figura 8), ainda pode-se observar a banda compreendida entre 140~260 KDa, apresentando, dessa vez, menor fosforilação nas infecções pelos isolados CG 347 na forma viável e CG 112 inativado. Diferentemente do período de 24 horas, é demonstrada uma banda entre 40~50 KDa que apresenta menor fosforilação quando comparada a de maior peso.

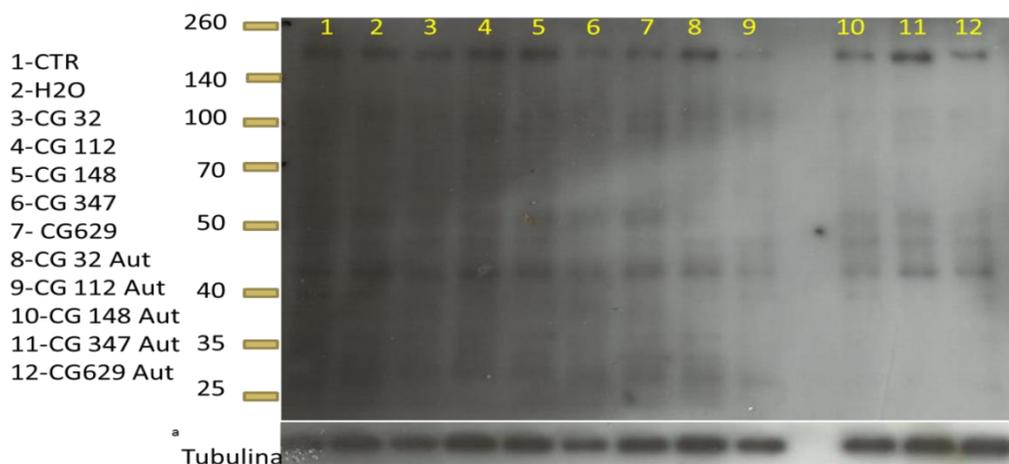


Figura 8. Perfil de fosforilação em tirosina em células de corpo gorduroso de *Rhipicephalus microplus* após 48 horas de tratamento com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra pTyr (PY99 SC 7020) e reveladas em kit ECL.

4.3.2 p-Ser

Outra forma de modulação do maquinário proteico da célula avaliado nesse estudo foi o perfil de fosforilação dessas proteínas em resíduos serina. No período de 24 horas após a infecção, observou-se apenas a presença de pequenas bandas de pouca fosforilação em toda a membrana, com duas bandas entre 50-70 KDa com bastante evidência. Não foi observado diferença significativa entre a fosforilação dessas bandas, somente um excesso de sinal demonstrado por “fantasmas” durante a revelação da banda de maior peso (Figura 9).

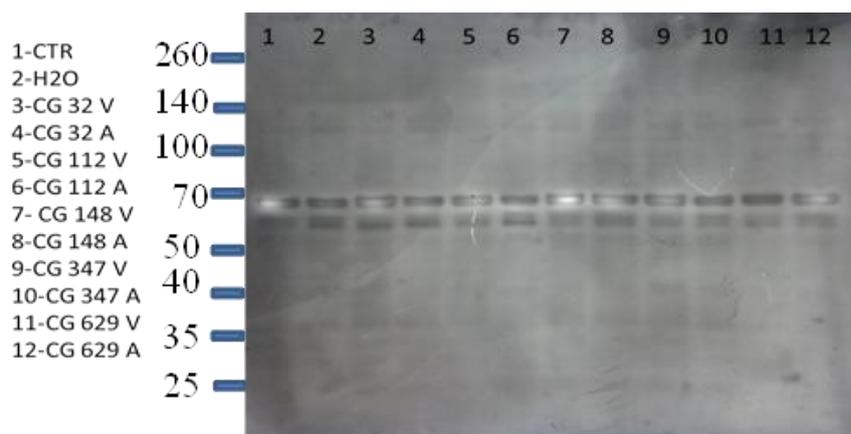


Figura 9. Perfil de fosforilação em serina em células de corpo gorduroso de *Rhipicephalus microplus* após 24 horas de tratamento com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra pSer(SC-81514) e reveladas em kit ECL.

Ao avaliar a fosforilação em serina após 48 horas de infecção, pode-se observar a presença de bandeamento bastante similar ao de 24 horas de infecção, porém uma das bandas de peso molecular entre 50~70 KDa se encontra fosforilada em serina apenas nos grupos tratados com fungos inativados e no tratamento com água destilada estéril e tween 80, desaparecendo nos grupos tratados com fungos viáveis (Figura 10), indicando modificações no metabolismo celular durante a infecção fúngica.

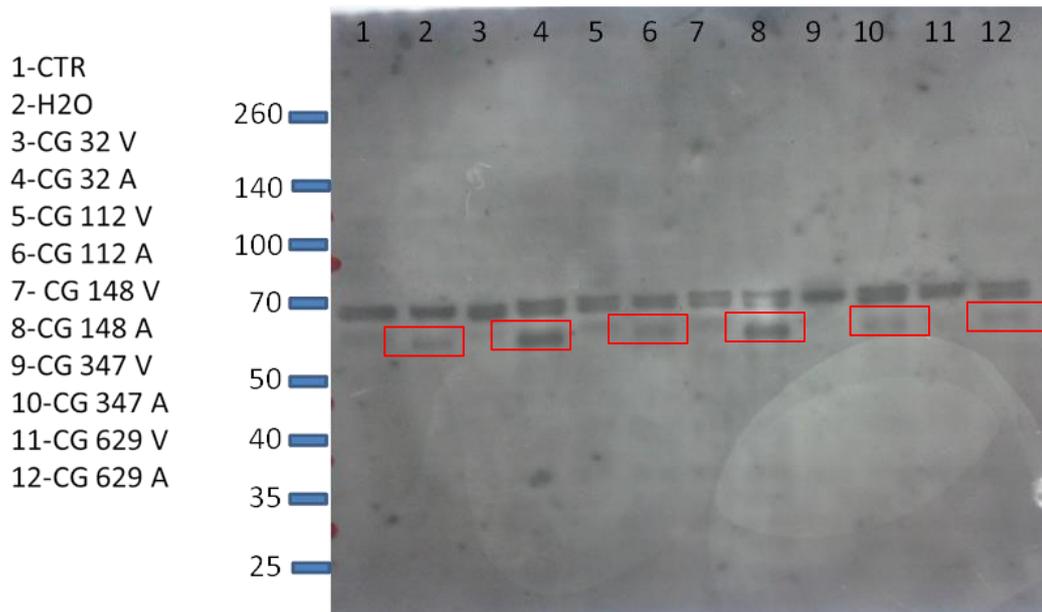


Figura 10. Perfil de fosforilação em serina em células de corpo gorduroso de *Rhipicephalus microplus* após 48 horas de tratamento com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l.. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra pSer(SC-81514) e reveladas em kit ECL. Em destaque, as bandas que se apresentaram de forma diferente entre os grupos.

4.3.3 p-ERK

Para a via ERK, apenas os fungos inativados foram capazes de aumentar a quantidade de enzima fosforilada, isto é, ativa, após 24 horas de tratamento (Figura 11), com exceção ao isolado CG 112 que não apresentou diferença significativa em nenhuma das duas formas de tratamento. Os demais isolados inativados aumentaram cerca de duas vezes a fosforilação da via, quando comparados ao controle. A fosforilação da enzima após o tratamento com fungos viáveis ficou bem próxima a ativação basal, isto é, do controle, demonstrando que o carrapato é incapaz de modular essa via nessas condições de infecção.

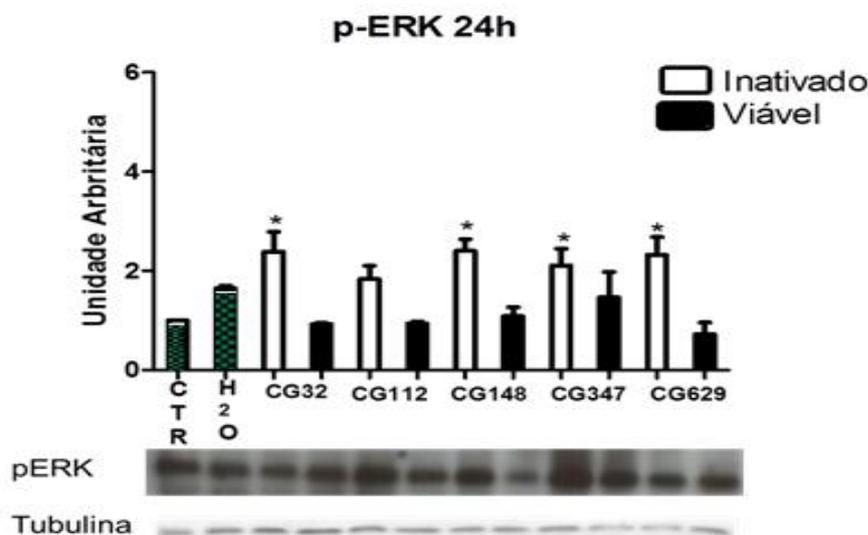


Figura 11. Detecção de fosforilação da enzima ERK em corpos gordurosos de *Rhipicephalus microplus* após período de 24 horas de tratamento por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra ERK 1/2 fosforilada (1:1000) e contra tubulina (1:10000), revelado por ECL. Foi realizada a densitometria da banda determinada com o programa Image Master Totallab. As barras representam a média ± o erro padrão e os asteriscos representam diferença estatística a 5% de significância segundo o teste de Tukey quando comparados ao controle. CTR= controle; H₂O= água destilada estéril acrescida de tween 80 0,01%

Após o período de 48 horas, apenas os isolados CG 32, CG 148 e CG 629 apresentaram modulação positiva da via no corpo gorduroso do carrapato de aproximadamente 2,2, 4,1 e 6,3 vezes, respectivamente, em comparação ao controle ao serem inoculados na forma inativada na hemocele. Curiosamente, o isolado CG 112 apresentou diferença estatística da forma inativa em relação a forma viável, porém quando comparadas ao controle, nenhum dos dois tratamentos apresentou diferença estatística. As fêmeas tratadas com água destilada estéril e Tween 80 0,01% e com os fungos viáveis não tiveram alteração na fosforilação quando comparadas ao controle sem tratamento, apesar disso, os isolados CG 32, CG 112 e CG 629 apresentaram marcada redução na fosforilação apesar de não significativa, comparados ao controle, segundo os testes estatísticos utilizados (Figura 12).

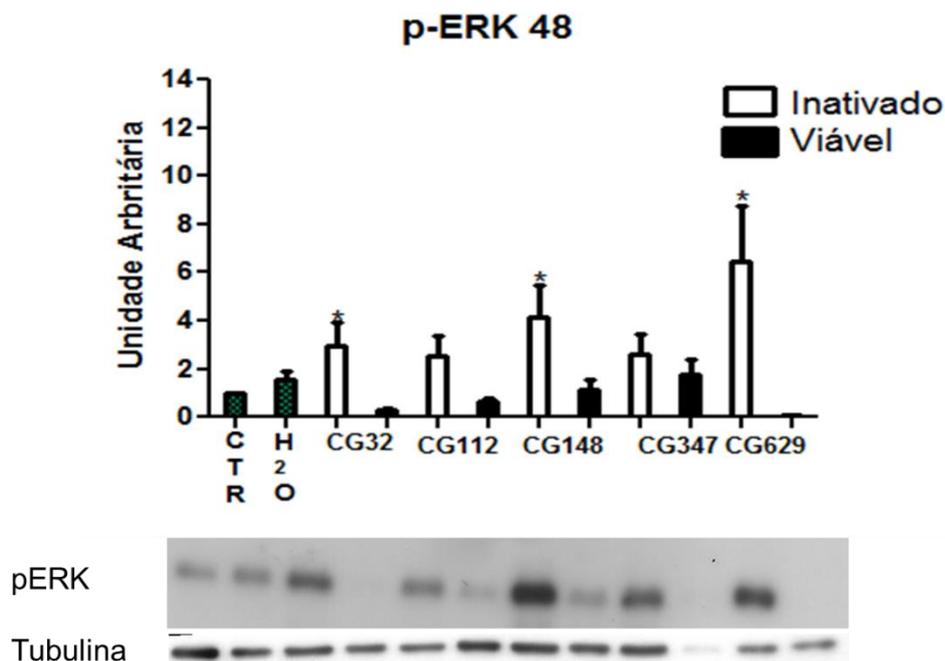


Figura 12. Detecção de fosforilação da enzima ERK em corpos gordurosos de *Rhipicephalus microplus* após o período de 48 horas de tratamento por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra ERK 1/2 fosforilada (1:1000) e contra tubulina (1:10000), revelado por ECL. Foi realizada a densitometria da banda determinada com o programa Image Master Totallab. As barras representam a média ± o erro padrão e os asteriscos representam diferença estatística a 5% de significância segundo o teste de Tukey quando comparados ao controle. CTR= controle; H₂O= água destilada estéril acrescida de tween 80 0,01%

4.3.4 p-AMPK

Na via AMPK, os isolados CG 32, CG 112 e CG 347 foram capazes de modular positivamente sua ativação com 24 horas de infecção após inoculação de conídios autoclavados (Figura 13) levando ao aumento de aproximadamente três, quatro e duas vezes em comparação ao controle, respectivamente. O isolado CG 112 foi capaz, também, de promover o aumento, cerca de três vezes, de fosforilação nas células do corpo gorduroso na infecção da forma ativa do conídio.

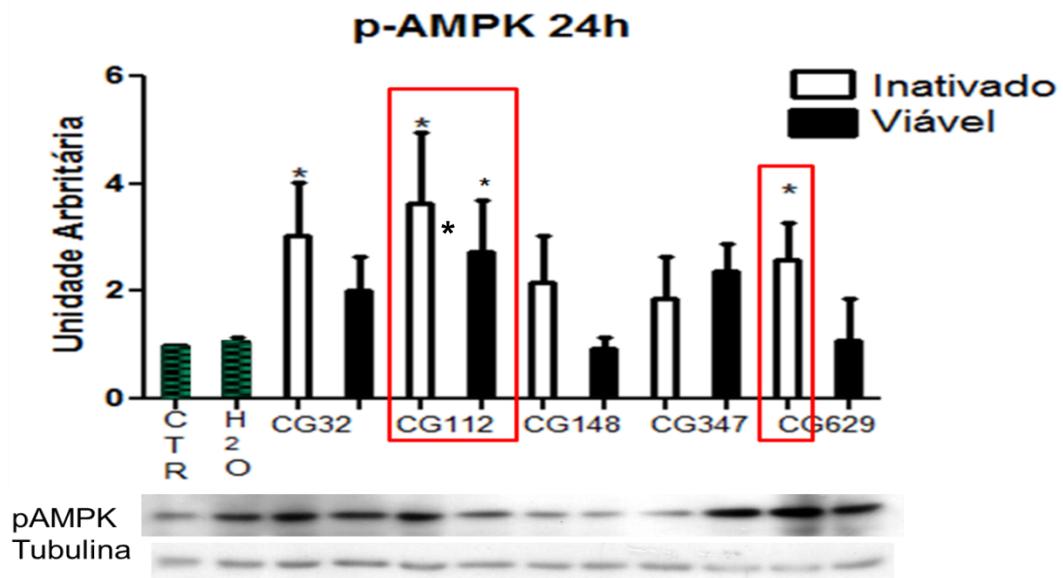


Figura 13. Detecção de fosforilação da enzima AMPK em corpos gordurosos de *Rhipicephalus microplus* após o período de 24 horas de tratamento. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra AMPK fosforilada (1:1000) e contra tubulina (1:10000), revelado por ECL. Foi realizada a densitometria da banda determinada com o programa Image Master Totallab. As barras representam a média ± o erro padrão e os asteriscos representam diferença estatística a 5% de significância segundo o teste de Tukey quando comparados ao controle. CTR= controle; H₂O= água destilada estéril acrescida de tween 80 0,01%.

Já com 48 horas, apesar de encontra-se diferenças até maiores em relação ao controle de todos os grupos testados, nenhum fungo foi capaz de modular de forma significativa essa via, provavelmente devido aos altos desvios padrões encontrados nas repetições analisadas (em que não se encontrou o mesmo padrão de fosforilação entre elas) (Figura 14).

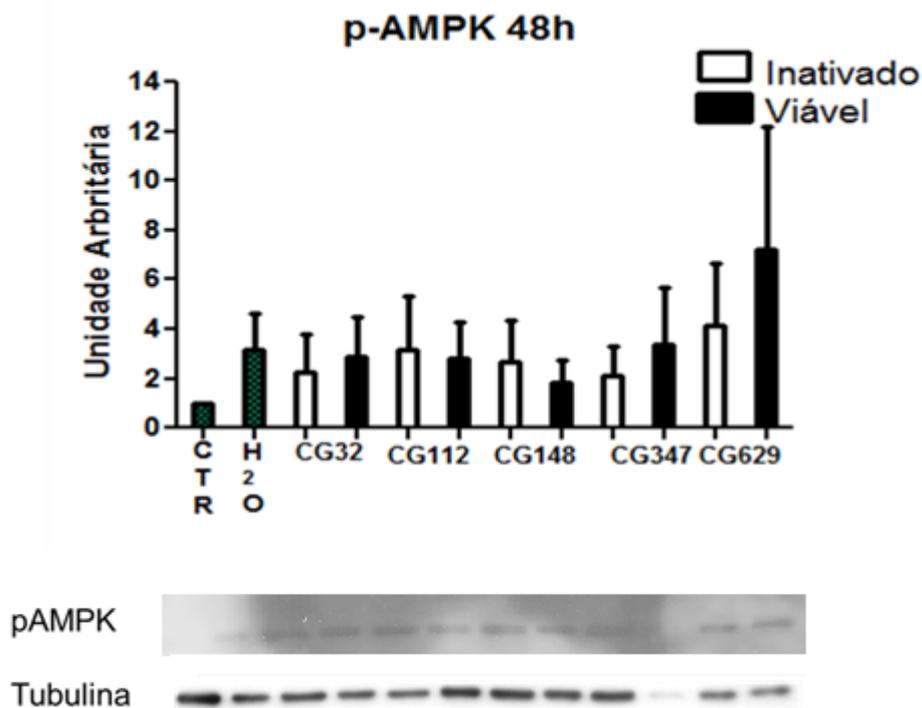


Figura 14. Detecção de fosforilação da enzima AMPK em corpos gordurosos de *Rhipicephalus microplus* após o período de 48 horas de tratamento por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Grupos contendo 10 fêmeas ingurgitadas que receberam tratamento controle ou foram infectadas com diferentes isolados de fungos viáveis ou autoclavados foram dissecados em salina 0,9% estéril e tiveram seus corpos gordurosos coletados. 30 µg de proteína do tecido foi aplicada no gel, eletrotransferido, incubado com anticorpo contra AMPK fosforilada (1:1000) e contra tubulina (1:10000), revelado por ECL. Foi realizada a densitometria da banda determinada com o programa Image Master Totallab. As barras representam a média ± o erro padrão e os asteriscos representam diferença estatística a 5% de significância segundo o teste de Tukey quando comparados ao controle. CTR= controle; H₂O= água destilada estéril acrescida de tween 80 0,01%.

5 DISCUSSÃO

5.1 Alterações no metabolismo lipídico

Apresentados os resultados obtidos nesse trabalho, pode-se observar que diferentes isolados fúngicos foram capazes de alterar os perfis lipídicos do corpo gorduroso do carrapato *Rhipicephalus microplus*, assim como alterar enzimas chaves na regulação de importantes vias metabólicas nesse órgão.

Durante um processo infeccioso, há um aumento da demanda energética pelo metabolismo, determinado pelo sistema imune, a fim de combater o agente causador. Diversos estudos demonstram que, em mamíferos, os níveis de triacilglicerol se encontram elevados no plasma durante processos inflamatórios, devido à lipólise iniciada pelo processo catabólico (KHOVIDHUNKIT et al. 2004; NASSAJI; GHORBANI, 2012). Outra alteração observada é o aumento dos níveis de colesterol no plasma de murinos acometidos por bacteremias, já em primatas há o efeito oposto nessa situação, ou seja, observa-se a diminuição nas taxas de colesterol plasmático durante uma infecção bacteriana (KHOVIDHUNKIT et al., 2004). Segundo esses autores, essas diferenças nos perfis lipídicos estão relacionadas ao aumento da demanda energética e ao papel pró e/ou anti-inflamatório que alguns lipídios possuem no metabolismo desses animais. Em insetos, Moret e Schmid-Hempel (2000) observaram que abelhas operárias desafiadas com moléculas ativadoras do sistema imune (lipopolissacarídeos) quando submetidas a jejum diminuíram drasticamente seu tempo de vida quando comparadas a abelhas que se alimentaram normalmente, demonstrando a necessidade de fontes energéticas durante a ativação do sistema imune. Desta forma, um patógeno que seja capaz de impedir a utilização da reserva energética por seu hospedeiro está, também, inibindo o sistema imune deste, facilitando assim sua infecção e desenvolvimento.

Nesse trabalho, foi demonstrado que após a infecção por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l., trofócitos do corpo gorduroso têm os níveis de triacilglicerol aumentados, quando comparados a células que não sofreram infecção, entre três a 10 vezes após 48 horas de infecção, dependendo do isolado. Mesmo após 24 horas de infecção, todos os isolados já foram capazes de levarem ao aumento dos níveis desse lipídio no tecido testado. Esses resultados são similares aos encontrados por Angelo et al. (2013) em que foi observado que, após 48 horas de infecção, há um grande aumento nos níveis de colesterol esterificado e de triacilglicerol no corpo gorduroso de *R. microplus* tratado com um isolado de *M. anisopliae* s.l., ao contrário do que acontece após o tratamento com o fungo *Beauveria bassiana* s.l., em que não há aumento nos níveis de lipídios no carrapato. Angelo et al. (2013) observaram discreto aumento após o tratamento com o veículo de inoculação quando comparados ao controle sem tratamento (água destilada estéril e Tween 80 0,01%) (fato não observado no presente trabalho), mostrando que o estresse de inoculação no carrapato pode levar a discreta resposta do carrapato. Os níveis de ácidos graxos livres também se encontraram elevados após 48 horas de infecção quando infectados pelos isolados de forma viável, porém no trabalho realizado por Angelo et al. (2013) não há avaliação dessa forma de lipídios.

Em contrapartida, a infecção pelo isolado CG 32 na forma inativada, após 24 horas, levou a discreta diminuição nos níveis de colesterol e ácido graxo, possivelmente em decorrência da injúria, ao serem usados na resposta ao antígeno detectado pelo sistema de defesa do carrapato. Curiosamente, apenas o isolado CG 112 foi capaz de levar a um aumento significativo dos níveis de triacilglicerol quando inativado após autoclavagem, sendo assim estudos posteriores envolvendo esse isolado devem ser realizados para entender o processo envolvido.

O principal lipídio constituinte dos ovos de carrapato é o triacilglicerol, sendo utilizado como uma fonte energética na formação do embrião. Os oócitos de insetos possuem a capacidade de produzir triacilglicerol a partir de ácidos graxos, porém de forma bastante limitada (ZIEGLER; VAN ANTWERPEN, 2006), sendo de grande importância as reservas maternas no corpo gorduroso para a constituição dos ovos. A não liberação ou o sequestro dessas moléculas pelo corpo gorduroso da fêmea deixa uma lacuna importante para a formação de ovos viáveis.

Manzano-Roman et al. (2008) demonstraram que a bactéria *Anaplasma phagocytophilum* é capaz de alterar a expressão de perilipinas das células infectadas, sendo assim capaz de alterar o metabolismo lipídico do hospedeiro facilitando sua infecção. Folly et al. (2003) e Atella et al. (2009), também, evidenciaram que diferentes protozoários são capazes de usar lipoproteínas da hemolinfa dos vetores como fonte de nutrientes para o seu desenvolvimento. Sendo assim, é possível que o fungo esteja manipulando essa via metabólica ao seu favor em busca de maior reserva nutricional de lipídios.

Além disso, diversos autores relatam a formação de corpúsculos lipídicos pelas células do hospedeiro induzidas por parasitos intracelulares. Corpúsculos lipídicos são organelas formadas por um núcleo de triglicerídios e colesterol esterificado envoltos por uma monocamada composta por fosfolipídios, colesterol e algumas proteínas envolvidas em processo de sinalização e mediadoras de inflamação (BOZZA et al., 2009; MELO et al., 2011). Esses corpúsculos estão diretamente ligados com a formação de prostaglandinas e eicosanoides, sendo, portanto, responsáveis pelo processo de amplificação da resposta imune do hospedeiro, principalmente, a parasitos intracelulares. Apesar disso, diversos protozoários, incluindo espécies de grande importância médica dos gêneros *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Toxoplasma*, mediam um aumento da formação dessas moléculas a partir de suas citocinas (JACKSON et al., 2004; NISHIKAWA et al., 2005; MELO et al., 2006, GOMES et al., 2014). Em infecção por *T. cruzi*, foi descrito que a ativação da via Toll por suas citocinas leva um aumento da formação de corpúsculos lipídicos e, em consequência disso, uma diminuição da eficiência dos macrófagos em fagocitar e amplificar o sinal da resposta imune (D'ÁVILA et al., 2011). A via Toll é uma importante via imune e é uma das vias envolvidas com resposta a infecção fúngica. Em *Aedes aegypti*, o fungo *B. bassiana* é capaz de levar a ativação dessa via imune durante sua infecção (DONG et al., 2012). Dito isso, outra hipótese a ser testada em estudos posteriores é a possível formação de corpúsculos lipídicos nesse órgão, em resposta à presença do fungo, o que explicaria o aumento dos níveis de lipídios que formariam essas estruturas.

Essa diferença encontrada no presente trabalho entre resposta do carrapato quando infectado por fungo viável ou autoclavado deve estar relacionada a uma característica da infecção fúngica. Ao penetrar na hemocele do artrópode, há um espessamento do corpo hifal, se dividindo em forma de blastosporo, que possui em sua parede estruturas totalmente diferentes das encontradas na superfície de conídios (WANG; ST LEGER, 2007). Como os fungos autoclavados não são capazes de formar essa estrutura (por estarem inativados), mantendo-se na forma de conídios que parecem ser, facilmente, reconhecidos e combatidos, sendo incapazes de gerar qualquer alteração no metabolismo lipídico do carrapato. Estudos ainda são necessários para elucidar melhor essa interação entre blastosporos e sistema imune dos artrópodes.

5.2 Alterações em vias metabólicas

Apesar da grande importância de carrapatos na saúde pública de todo mundo, artigos disponíveis na literatura que envolvam sinalização celular, nesse modelo, são raros. Quando se limita a busca a *R. microplus*, o número de resultados se aproxima a zero. Sendo assim, há

uma clara lacuna de conhecimento sobre esse parasito tão importante que, apenas nos últimos anos começa a ser preenchida.

Como não há muitos detalhes metabólicos para esse carrapato na literatura, o primeiro passo desse trabalho foi verificar o efeito da infecção fúngica sobre a fosforilação de proteínas, por esse ser o mecanismo pós traducional mais comum de controle da atividade biológica de proteínas. Olsen et al. (2006) estimaram que 86,4% da fosforilação de proteínas aconteça em resíduos serina, 11,8% em resíduos treonina e 1,8% em resíduos de tirosina. Os resíduos fosforilados em tirosina fazem parte de uma fina sintonia metabólica, estando no topo de cascatas de sinalização sendo responsáveis por iniciar o processo para diversas vias metabólicas de grande abrangência nas células. No presente trabalho, não ficou evidenciada nenhuma diferença significativa no perfil de fosforilação em resíduo tirosina, não havendo o aparecimento ou uma maior evidenciação de nenhuma banda por *Western Blotting*. Como essa fosforilação pode ser transiente em outros modelos de artrópodes (JABLONKA et al., 2011), outros estudos podem ser realizados afim de detectarem pequenas alterações nesse perfil em um menor espaço de tempo.

Apesar de não muito específica, a detecção de diferenças na fosforilação de resíduos fosforilados em serina demonstra uma maior manipulação do metabolismo das células investigadas, já que a grande maioria das proteínas reguladas por fosforilação pode estar envolvida com essa diferença. Nesse experimento, foi observado a evidenciação de uma banda entre 50 e 70 KDa quando o carrapato foi exposto ao tratamento controle com água destilada e Tween 80 assim como nos tratamentos com fungos autoclavados, demonstrando que essa injúria é capaz de levar à uma alteração no perfil normal da célula. A não evidenciação dessa banda no tratamento com fungos viáveis demonstra uma clara manipulação metabólica durante a infecção fúngica, porém mais estudos são necessários para podermos afirmar se isso por manipulação fúngica sobre o metabolismo do carrapato (a fim de driblar o sistema imune) ou se faz parte de uma resposta do artrópode contra essa infecção (respondendo de forma diferente da qual quando o fungo não apresenta virulência).

Diante dessas informações, buscou-se avaliar a ativação de importantes alvos metabólicos que estivessem diretamente envolvidos com sistema imune e metabolismo lipídico e que fossem ativados ou inibidos por fosforilação em resíduos serina, sendo escolhidas as enzimas ERK e AMPK como elementos de estudo por possuírem essa característica.

A ativação da via ERK apenas pelos fungos inativados demonstra que essa via possui importante papel no reconhecimento desses antígenos. García-García et al. (2008) demonstraram a importância de enzimas da família ERK na regulação de resposta imune de mexilhões. A via ERK está relacionada à diferenciação celular e produção de ROS, etapas importantes para resposta imune celular de carrapatos. De alguma forma ainda não elucidada, a forma de blastosporo (ativa) consegue evadir esses mecanismos de reconhecimento e ativação dessa importante via.

Em relação aos resultados encontrados na avaliação do metabolismo lipídico, a lipólise possivelmente induzida após a modulação positiva dessa via pode estar sendo compensada pelo aumento da captação de lipídios provenientes da dieta. Esperava-se que os níveis de ativação dessa via fossem modulados negativamente com fungos na forma ativa, porém a diferença não foi significativa em relação ao controle. No presente estudo, não foi avaliado a ativação de proteína cinase A (PKA), não sendo possível especular se há um déficit na lipólise por deficiência da ação conjunta dessas enzimas como ocorre em mamíferos. Estudos posteriores são necessários para melhor elucidar o papel dessa enzima na resposta a infecção fúngica em carrapatos.

A AMPK é relatada na literatura como a enzima chave no controle energético de diversos animais, sendo responsável por comandar diversas ações catabólicas em períodos de alta

demanda energética (GOWANS; HARDIE, 2014). Sendo assim, seria de se imaginar que as fêmeas infectadas com fungos viáveis sofressem maior ativação dessa via metabólica, pois essas passam pelos estresses metabólicos de formação de ovos em conjunto com a infecção de um patógeno, necessitando de alta quantidade de energia para suprir esse alto desbalanço energético. Porém, curiosamente o resultado encontrado nesse presente estudo é diferente do esperado. Apenas um isolado fúngico (CG 112) foi capaz de modular positivamente essa via no período de 24 horas, sendo os isolados CG 32, CG 112 e CG 629 capazes de modular positivamente essa ativação somente na forma inativada.

A AMPK é uma enzima que se encontra no topo das vias que controlam o metabolismo lipídico das células, sendo imprescindível na ativação de vias responsáveis pela quebra de lipídios para liberação de energia, ou seja, favorecendo a beta oxidação e, também, aumentando as formas de captação (STEINBERG; KEMP, 2009).

Logo, para os fungos inativados, possivelmente, o aumento do grau de ativação dessa via, sem que haja significativa queda dos níveis de lipídios nessas células quando comparado ao controle, mesmo com maior quebra devido à resposta imune, deve estar relacionado com maior captação na dieta (principal fonte de lipídios para o carrapato). Além disso, esse período é também o de maior produção de vitelogenina pelo carrapato (UMEMIYA-SHIRAFUJI et al., 2012), necessitando de energia para completar essa produção. Curiosamente, há uma contradição entre os níveis de lipídios encontrados após os tratamentos com fungos viáveis em comparação aos níveis de ativação da AMPK. De acordo com o descrito na literatura, esperava-se uma diminuição dos níveis de ativação dessa enzima quando comparado ao controle, o que justificaria a diferença entre os níveis de lipídios encontrados, porém o encontrado foi a manutenção dos níveis basais de ativação. Ou ainda, um aumento dos níveis da AMPK inibindo a lipólise, o que também não ocorreu. Sendo assim, estudos posteriores devem ser realizados para melhor elucidação dessa incongruência metabólica.

Por ser um estudo pioneiro, sobre um assunto de grande importância e complexidade, os resultados ainda demonstram algumas lacunas de conhecimento sobre a fisiologia do carrapato *R. microplus*. Porém, agrega à literatura um conhecimento básico necessário para que, em estudos posteriores, essas perguntas possam ser respondidas, dando continuidade a essa importante linha de pesquisa. Um melhor conhecimento sobre essas vias pode levar a descoberta de possíveis alvos vacinais, que seriam de grande relevância para o controle desses artrópodes.

6 CONCLUSÕES

- A infecção por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* é capaz de alterar o metabolismo lipídico das células do corpo gorduroso de *Rhipicephalus microplus*, principalmente em relação aos níveis de triacilglicerol.
- A resposta metabólica do carrapato *R. microplus* é diferenciada mediante a inoculação de antígenos não patogênicos quando comparados à resposta a fungos entomopatogênicos.
- As vias ERK e AMPK estão alteradas durante a resposta imune de *R. microplus* após a infecção por diferentes isolados de *M. anisopliae*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.B.; TORTELLI, F.P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J.L.M.; SOARES, M.P.; FARIAS, N.A.R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. Tristeza parasitária bovina na região Sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, p. 237-242, 2006.
- ALVES, S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- ALVES, S.B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, p. 77-86, 1992.
- ANDERSON, J.L.; MAGNARELLI, L.A. Biology of ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 22, p. 195-215, 2008.
- ANGELO, I. C., FERNANDES, E. K. K., BAHIENSE, T. C., PERINOTTO, W. M. S., MORAES, A. P. R., TERRA, A. L. M., BITTENCOURT, V. R. E. P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*. v. 172, p. 317-322, 2010.
- ANGELO, I.C.; GOLO, P. S.; PERINOTTO, W.M.S ; CAMARGO, M.G. ; QUINELATO, S.; SÁ, F.A. ; PONTES, E.G. ; BITTENCOURT, V.R.E.P. . Neutral lipid composition changes in the fat bodies of engorged females *Rhipicephalus microplus* ticks in response to fungal infections. *Parasitology Research*, v. 112, p. 501-509, 2013.
- ANGEL-SAHAGÚN, C.A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA J.; GALINDO-VELASCO, E.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; REYES-VELÁZQUEZ, W.P.; SKODA, S.R.; FOSTER, J.E. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). *Journal of Insect Science*, v.5, p.1-8, 2005.
- ARRESE, E.L.; SOULAGES, J.L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*, v. 55, p. 207-225, 2010.
- ARRUDA, W.; LÜBECK, I.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Morfological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* tick. *Experimental Applied Acarology*. v37, n3-4 p 231–244. 2005.
- ATELLA, G; BITTENCOURT-CUNHA, P; NUNES, R.; SHAHABUDDIN, M; SILVA-NETO, M . The major insect lipoprotein is a lipid source to mosquito stages of malaria parasite. *Acta Tropica*, v. 109, p. 159-162, 2009.
- BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Veterinary Parasitology*, v. 141, p. 319-324, 2006.
- BAPAT, S.; VERKLEIJ, A.; POST, J.A. Peroxynitrite activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) via a MEK-independent pathway: a role for protein kinase C. *FEBS Letters* , v. 499, p. 21-26, 2001.

BARROS, S.L.; MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; MENK, C.; ALMEIDA, M.A.O.; MELO, E.P.S.; KESSLER, R.H. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 100, p. 513-517, 2005.

BATEMAN, R. P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annals of Applied Biology*, v. 122, p. 145-152, 1993.

BEATI, L.; KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationships among ticks genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari:Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*, v. 87, p. 32-48, 2001.

BEG, ZH.; ALLMANN, D.W.; GIBSON, D.M. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme: a reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.v.54, p.1362–1369, 1973.

BENAVIDES, E.; RODRÍGUEZ, J.L.; ROMERO, A. Isolation and partial characterization of the Montecitos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1877) multiresistant to different acaricides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, p.668–671, 2000.

BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, T.M.; DEKONING, J.; CROOS, J.N. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 1335–1342, 2001.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, v. 101, p. 512-530, 2009.

BONEN, A.; CHABOWSKI, A.;LIUKEN, J.J.F.P.; GLATZ, J.F.C. Mechanisms and Regulation of Protein-Mediated Cellular Fatty Acid Uptake: Molecular,Biochemical, and Physiological Evidence. *Physiology*, v. 22, p. 15-28, 2007.

BOZZA, P. T.; MAGALHAES, K. G.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica and Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1791, p. 540-551, 2009.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, v. 105, p. 874-882, 2001b.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, v.74, p.734-739, 2001a.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental Comparative Immunology*, v. 23, n. 4-5, p. 329-344, 1999.

BULLMAN, G.M.; MUÑOS CABENAS, M.E.; AMBRÚSTOLO, R.R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. *Veterinaria Argentina*, v. 8, p. 3-15, 1996.

CAGAN, L.; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the european corn borer. *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Central European Agriculture*, v. 2, p. 227-233, 2001.

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

CAMARGO-MATHIAS, M. I. *Guia Básico de Morfologia Interna de Carrapatos Ixodídeos*. São Paulo: EDUNESP, 2013. 121p .

CARLING, D. The AMP-activated protein kinase cascade-a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences*, v.29, p. 18-24, 2004.

CARLING, D.;ZAMMIT, V.A.; HARDIE, D.G. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters*, v. 223, p. 217–222, 1987.

CARLSON, C.A.; KIM, K.H. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 248, p. 378–380, 1973.

CASTRO-JANER, E.; MARTINS, J.R.; MENDES, M.C.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G.M.; SCHUMAKER. T.T. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*) using in vitro larval bioassays. *Veterinary Parasitology*, v. 173, p. 300–306,2010.

CHAPMAN, R. F. *The Insects: structure and function*. 4ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 929p.

CHEN, J.W.; LIU, B.L.; TZENG, Y.M. Purification and quantification of destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Chromatography*, v. 830, p. 115-125, 1999.

COHEN, E. *Fat body*. In: Resh, V.H.; Cardé, R.T. *Encyclopedia of Insects*. 2ed: London, Academic Press. 2009. 1024p.

CONSTANTINOIU, C.C.; JACKSON, L.A.; JORGENSEN, W.K.; LEW-TABOR, W.E.; PIPER, E.K.; MAYER, D.G. VENUS, B.; JONSSON, N.N. Local immune response against larvae of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *International Journal for Parasitology*, v. 40, p. 865–875, 2010.

CORREIA, A.C.B.; FIORIN, A.C.; MONTEIRO, A.C.; VERÍSSIMO,C.J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 71, p. 189-191, 1998.

COSTA, G.L.; SARQUIS, M.I.M.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*, v. 154, p. 207-209, 2002.

DAVAL, M.; DIOT-DUPUY, F.; BAZIN, R. HAINAULT, I.; VIOLLET, B.; VAULONT, S.; HAJDUCH, E.; FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. Protein Kinase in Rodent Adipocytes Anti-lipolytic Action of AMP-activated. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 25250 – 25257, 2005.

DAVIES, S.P.; HELPS, N.R.; COHEN, P.T.W.; HARDIE, D.G. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C and native bovine protein phosphatase-2Ac. *FEBS Letters*, v. 377, p. 421-442, 1995.

D'ÁVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L.; BARJA-FIDALGO, C. ; SILVA, A.R.; MELO, R.C.N. ; REIS, G.; CASTRO- FARIA- NETO, H.C. ; BOZZA, P. T. . Host Cell Lipid Bodies Triggered by *Trypanosoma cruzi* Infection and Enhanced by the Uptake of Apoptotic Cells Are Associated With Prostaglandin E2 Generation and Increased Parasite Growth. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 204, p. 951-961, 2011.

DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; MATHIAS, M. I. New morphological data on fat bodies of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Micron*, v. 39, n. 7, p. 875-83, 2008.

DESTÉFANO, R.H.R.; DESTÉFANO, S.A.L.; MESSIAS, C.L. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, p. 245-252, 2004.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. *Compendium of soil fungi*. New York: Academic. v.1. p. 859,1980.

DONG, Y.; MORTON JR, J.C.; RAMIREZ, J.L.; SOUZA-NETO, J.A.; DIMOPOULOS, G. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 42, p. 126-132, 2012.

DRIVER, F.; MILNER, R.J.; TRUEMAN, J.W.H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, v. 104, p. 134-150, 2000.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, v.46, p. 387–400, 2001.

EILENBERG, J.; MEYLING, N. V.; JENSEN, A. B. *Insect pathogenic fungi in biological control: status and future challenge* In: EHLERS, R.U.; CRICKMORE, N.; ENKERLI, J.; GLAZER, I.; LOPEZ-FERBER, M.; TKACZUK, C. *IOBC wprs Bulletin*, International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants, pp. 7-10, 2009.

ERTHAL JR, M. *Controle biológico de insetos praga*. In: I Seminário Mosaico Ambiental: Olhares sobre o Ambiente, 2011, Campos dos Goytacazes, RJ. Anais do I Seminário Mosaico Ambiental. Campos dos Goytacazes: Editora Escrita, 2011. v. 1. p. 1-15.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J.M.; NAVA, S; MANGOLD, A.; GUGLIELMONE, A.A.; LABEUMA, M.B.; FUENTE, J. Reinstatement of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *australis* (Acari: Ixodidae) With Redescription of the Adult and Larval Stages. *Journal of Medical Entomology*, v. 49, p. 794-802, 2012.

FANG, W.; VEJA-RODRIGUEZ, J.; GLOSH, A.K.; KANG, A.; ST LEGER, R.J. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science*, v. 331, p.1074-1077, 2011.

FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, v. 43, p. 237-256, 2007.

FERNANDES, É. K. K. ; MORAES, Á. M. L. ; PACHECO, R. S. ; RANGEL, D. E. N. ; MILLER, M. P. ; BITTENCOURT, V. R. E. P. ; ROBERTS, D. W. . Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, p. 760-774, 2009.

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 96, p. 237–243, 2007.

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 98, p. 69–78, 2008.

FERNANDES, E.K.K. ; COSTA, G.L. ; SOUZA, E.J. ; MORAES, A.M. L. ; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Beauveria bassiana* isolated from engorged females and tested against eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Basic Microbiology*, v. 43, p. 393-398, 2003.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental and Applied Acarology*, v. 46, p.71-93, 2008.

FERNANDES, É.K.K.; KEYSER, C.A.; CHONG, J.P.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, M.P.; ROBERTS, D.W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, p. 115-128, 2010.

FERNANDES, É.K.K.; ANGELO, I.C.; RANGEL, D.E.N.; BAHIENSE, T.C.; MORAES, A.M.L.; ROBERTS, D.W.; BITTENCOURT, V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 182, p. 307-318, 2011.

FERNÁNDEZ-SALAS, A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; ALONSO-DÍAZ, M.A. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multiresistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, v. 183, p. 338–342, 2012.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: EMBRAPA–CENARGEN, 1998. 220p.

FOGAÇA, A. C.; DA SILVA, P. I.; JR., MIRANDA, M. T.; BIANCHI, A. G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P. E.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *Journal of Biological Chemistry*, v.274, n.36, p.25330-4, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *World Livestock 2011: Livestock in food security*, 2011. Disponível em: www.fao.org/docrep/014/i2373e/i2373e.pdf

FOLLY, E. ; SILVA, N. C. E. ; LOPES, A. H. ; SILVA-NETO, M. A. C. ; ATELLA, G. C. . *Trypanosoma rangeli* uptakes the main lipoprotein from the hemolymph of its invertebrate host. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 310, p. 555-561, 2003.

FRANQUE, M.P.; SANTOS, H.A.; LINAREZ, F.F.M.; MASSARD, C.L. Experimental equine infestation by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ciência Rural*, v. 39, p. 2117-2122, 2009.

FRAZZON, A.P.G.; VAZ JR, I.S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 94, p. 117–125, 2000.

FREED, S.; JIN, F.L.; REN, S.X. Determination of genetic variability among the isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from different geographical origins. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 359-370, 2011.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. *Caderno Técnico da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais*, v. 8, p. 49-61, 1993.

FURLONG, J., MASSARD, C. de A. *Controle do carrapato dos bovinos*. In: FURLONG, J. Manejo sanitário, prevenção e controle de parasitoses e mamite em rebanhos de leite. EMBRAPA-CNPGL, p.37-48, 1994.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S. *Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas*. Circular Técnica n. 59-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 2000. 25p.

FURLONG, J.; PRATA, M.C.; MARTINS, J.R.S., COSTA JR, L.M.; COSTA, J.C.R.M; VERNEQUE, R.S. *Diagnóstico in vitro da sensibilidade do carrapato Boophilus microplus a acaricidas*. In: Anais...XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Ouro Preto, v. 13, p. 305, 2004.

FURLONG, J. *Carrapatos: problemas e soluções*. Juiz de Fora: EMBRAPA, 2005.62p

GARCÍA-GARCÍA, E.; PRADO-ÁLVAREZ, M.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A.; ROSALES, C. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 32, p. 637–653, 2008.

GARCIA, M. V; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J.; MOCHI, D.A.; SIMI, L.D.; CARVALHO, W.M.; TSURUTA, S.A.; BARBOSA, J.C. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 181, p. 267– 273, 2011.

GEHART, H.; KUMPF, S.; ITTNER, A.; RICCI, R. MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness? *EMBO Reports*, v. 11, p. 834-840, 2010

GEORGE, J.E.; POUND, J.M.; DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*. v. 129. p. 353-366. 2004.

GOETTEL, M.S.; POPRAWSKI, T.J.; VANDENBERG, J.D. *Safety of non-target invertebrates to fungal biocontrol agents*. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W. *Safety of Microbial Insecticides*. Boca Raton: CRC Press Inc, 1990, p. 115-132.

GOHIL, S.; HERRMANN, S.; GÜNTHER, S.; COOKE, B.M. Bovine babesiosis in the 21st century: Advances in biology and functional genomics. *International Journal for Parasitology*, v. 43, p. 125–132, 2013.

GOLO, P.S. ; ANGELO, I.C.; Camargo, M.G. ; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Effects of destruxin A on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* .v. 20, p. 338-341, 2011.

GOMES, A.F.; MAGALHÃES, K.G.; RODRIGUES, R.M.; CARVALHO, L.; MOLINARO, R.; BOZZA, P.T.; BARBOSA, H.S. Toxoplasma gondii-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- γ and PGE₂. *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 47-59, 2014.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. *Ciência Rural*, v. 30, p. 187-194, 2000.

GONZÁLES, J.C. *O carrapato do boi: vida, resistência e controle*. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 101p.

GONZALEZ, F. A.; RADEN, D.L.; DAVIS, R.J. Identification of Substrate Recognition Determinants for Human ERK1 and ERK2 Protein Kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 22159-22163, 1991.

GONZÁLES, J. C.; SERRA-FREIRE, N. M. O couro dos bovinos do Rio Grande do Sul: riqueza há muito maltratada. *A Hora Veterinária*, v. 12, p. 14-16, 1992.

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

GOWANS, G.J.; HARDIE, D.G. AMPK: a cellular energy sensor primarily regulated by AMP. *Biochemical Society Transactions* v. 42, p. 71–75, 2014.

GRAF, J.F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G.A.; MOLENTO, M.B.; BORDINI, E.L. ARANTES, G.J. Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, v. 129, p. S427–S442, 2004.

GREENBERG, A.S.; SHEN, W.J.; MULIRO, K.; PATEL, S.; SOUZA, S.C; ROTH, R.A.; KRAEMER, F.B. Stimulation of Lipolysis and Hormone-sensitive Lipase via the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, v. 21, p. 8-10, 2002.

GUO, H-L.; YE, B-L.; YUE, Y-Y.; CHEN, Q-T.; FU, C-S. Three new species of *Metarhizium*. *Acta Mycologica Sinica*, v. 5, p. 177-184, 1986.

HARDIE, DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*, v. 144, p. 5179-5183, 2003.

HARDIE, D.G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development* v. 2, p:1895-1908, 2011.

HAWLEY, S.A.; ROSS, F.A.; CHEVTZOFF, C.; GREEN, K.A.; EVANS, A.; FOGARTY, S.; TOWLER, M.C.; BROWN, L.J.; OGUNBAYO, O.A.; EVANS, A.M.; HARDIE, D.G. Use of cells 109 expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metabolism*, v. 11, p. 554-565, 2010.

HORN, S. C. *Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos no Brasil*. Boletim de Defesa Sanitária Animal, 1983. 15p.

HUANG, B.; LI, C.; HUMBER, R.A.; HODGE, K.T.; FAN, M; LI, Z. Molecular evidence for the taxonomic status of *Metarhizium taii* and its teleomorph, *Cordyceps taii* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Mycotaxon*, v. 94, p. 137-147, 2005.

HURLEY, R.L.; BARRÉ, L.K.; WOOD, S.D.; ANDERSON, K.A.; KEMP, B.E.; MEANS, A.R.; WITTERS, L.A. Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 281, p. 36662-36672, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Produção da Pecuária Municipal*, v.39, 2011, Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/comentarios.pdf

JABLONKA, W. ; SENNA, R ; NAHU, T. ; VENTURA, G. ; MENEZES, L. ; SILVA-NETO, M.A.C . A transient increase in total head phosphotyrosine levels is observed upon the emergence of *Aedes aegypti* from the pupal stage. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* , v. 106, p. 546-552, 2011.

JACKSON, K.E.; KLONIS, N.; FERGUNSON, D.J.P.; ADISA, A.; DOGOVSKI, C.; TILLEY, L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, v.54, p.109–122, 2004.

JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *Journal of Medical Entomology*, v. 35, p. 458-464, 1998.

JONSSON N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, v. 137, p. 1-10, 2006.

JONSSON, N.; BOCK, R.E.; JORGENSEN, W.K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Veterinary Parasitology*, v.155, p.1–9, 2008.

KAAYA G.P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides from tick control. *Experimental Applied Acarology*, v. 24, p. 913–926, 2000.

KAWOOYA, J. K.; LAW, J.H. Role of lipophorin in lipid transport to insect egg. *The Journal of Biological Chemistry*, v.263, p.8748-8753, 1988.

KANZOK, S.M.; JACOBS-LORENA, M. *Entomopathogenic* fungi as biological insecticides to control malaria. *Trends Parasitology*, v. 22, p. 49–51, 2006.

KASAI, N.; LABRUNA, M.B.; PIRES, A.V.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.G. Dinâmica populacional de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em bovinos leiteiros mantidos em manejo de pastejo rotativo de capim-elefante. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52 , p. 453-458, 2000.

KHOVIDHUNKIT, W.; KIM, M.S.; MEMON, R.A.; SHIGENAGA, J.K.; MOSER, A.H.; FEINGOLD, K. H.; GRUNFELD, C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *Journal of Lipid Research*, v.45, p. 1169-1191, 2004.

KINKL, N.; SAHEL, J.; HICKS, D. Alternate FGF2-ERK1/2 Signaling Pathways in Retinal Photoreceptor and Glial Cells *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 43871–43878, 2001.

KISZEWSKI, A.E.; MATUSCHKA, F.R.; SPIELMAN, A. Mating strategies and spermiogenesis in Ixodid ticks. *Annual Review of Entomology*, v. 46, p. 167-182, 2001.

KUNZ S.E.; KEMP, D.H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact, *Revue Scientifique et Technique*, v. 13, p. 1249-1286,1994.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680–685, 1970.

- LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 97, p. 40-49, 2008.
- LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B.; OLIVEIRA, P.R. *In vitro* susceptibility of engorged females from different populations of *Boophilus microplus* to comercial acaricides. *Revista Brasileira de Parasitologia*, v.4, p. 283-294, 1995.
- LIANG, Z.Q.; LIU A.Y.; LIU J.L. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. *Acta Mycologica Sinica*, v, 10, p. 257–262, 1991.
- LIPOVSEK, S.; NOVAK, T.; JANZEKOVIC, F.; PABST, M.A. Role of the fat body in the cave crickets *Troglophilus cavicola* and *Troglophilus neglectus* (Rhaphidophoridae, Saltatoria) during overwintering. *Arthropod Structure & Development*, v. 40,p. 54-63, 2011.
- LIU, Z.Y.; LIANG, Z.Q.; WHALLEY, A.J.S.; YAO, Y.J.; LIU, A.Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 78, p. 178–182, 2001.
- LIU, Z.Y.; LIU, A.Y.; YAO, Y.J.; HYDE, K.D.; YU, Z.N. Molecular evidence for teleomorph-anamorph connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8S rDNA sequences. *Mycological Research*, v. 106, p. 1100-1108, 2002.
- LOGULLO, C.; DA SILVA VAZ, I.; SORGINE, M.H.F.; PAIVA-SILVA, G.O.; FARIA, F.S.; ZINGALI, R.B.; DE LIMA, M.F.R.; ABREU, L.; FIALHO OLIVEIRA, E.; ALVES, E.W.; MASUDA, H.; GONZÁLES, J.C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P.L. Isolation of aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*, v. 116, p. 525-232, 1998.
- LONG, Y.C.; BARNES, B.R.; MAHLAPUU, M.; STEILER, T.L.; MARTINSSON, S.; LENG Y.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.; ANDERSSON,L.; ZIERATH, J.R. Role of AMP-activated protein kinase in the coordinated expression of genes controlling glucose and lipid metabolism in mouse white skeletal muscle. *Diabetologia*, v. 48, p. 2354–2364, 2005.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. v.193, p. 265-275, 1951.
- LUBECK, I.; ARRUDA, W.; SOUZA, B.K.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C.R.; SCHANK, A.; VAINSTAIN, M.H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as a potential biocontrol of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecology*, v. 1, p. 78-88, 2008.
- LUIKEN, J.J.F.P.; COORT, S.L.; WILLEMS, J.; COUMANS, W.A.; BONEN, A.; VAN DER VUSSE, G.J.; GLATZ, J.F. Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes*, v. 52,p.1627-1634,2003.
- LUZ, C.; TIGANO, M.S.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.93, p.839-846, 1998.

MANZANO-ROMAN, R.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M.; de la FUENTE, J. Expression of perilipin in human promyelocytic cells in response to *Anaplasma phagocytophilum* infection results in modified lipid metabolism. *Journal of Medical Microbiology*, v. 57, p. 159-163, 2008.

MARTINS, J.R.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Veterinary Record*, p. 149, .p. 64, 2001.

MATA, R.F.F. *Efeito de extratos aquosos de Cabralea canjerana subsp. polytricha (Adr. Juss) Penn. (Meliaceae) no controle biológico de Brevycorine brassicae (L.) (Hemiptera: Aphididae) e Ascia monuste orseis (Godart) (Lepidoptera: Pieridae)*. 2007. 66p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

MELO, R.C.N.; FABRINO, D.L.; DIAS, F.F.; PARREIRA, G.G. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflammation Research*, v. 55, p. 342-348, 2006.

MELO, R. C. N.; D'AVILA, H.; WAN, H.-C.; BOZZA, P. T.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Lipid Bodies in Inflammatory Cells: Structure, Function, and Current Imaging Techniques. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 59, p. 540-556, 2011.

MENDES, M. C.; PEREIRA, J. R.; PRADO, A. P. Sensitivity of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids and organophosphate in farms in the Vale do Paraíba region, São Paulo, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 74, p. 81-85, 2007.

MENDES, M.C.; DUARTE, F.C.; MARTINS, J.R.; KLAFKE, G.M.; FIORINI, L.C.; BARROS, A.T.M. Characterization of the pyrethroid resistance profile of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* populations from the states of Rio Grande do Sul and Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, p. 379-384, 2013.

MILNER, R.J.; LOZANO, L.B.; DRIVER, F.; HUNTER, D. A comparative study of two Mexican isolates with an Australian isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain characterisation, temperature profile and virulence for wingless grasshopper, *Phaulacridium vittatum*. *Biocontrol*, v. 48, p. 335-348, 2003.

MOHANTY, S.S.; RAGHAVENDRA, K.; MITTAL, P.K.; DASCH, A.P.. Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 10, p. 199-202, 2008.

MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C.; CORREIA, A.C.B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Mestsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Revista de Microbiologia*, v. 29, p. 109-112, 1998.

MORANDO, A.; GELINSKI, J.M.L.N. Estudo preliminar do desenvolvimento embrionário *in vitro* de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Unoesc & Ciência – ACBS*, v. 1, p. 23-28, 2010.

- MORET, Y; SCHMID-HEMPEL, P. Survival for Immunity: The Price of Immune System Activation for Bumblebee Workers. *Science*, v.290, p. 1166-1168.
- MUNDAY, M.R.; CAMPBELL, D.G.; CARLING, D.; HARDIE, D.G. Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *European Journal of Biochemistry*, v. 175, p. 331–338, 1988.
- MUOIO, D.M.; SEEFELD, K.; WITTERS, L.A.; COLEMAN, R.A. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochemical Journal*, v. 338, p. 783-791, 1999.
- MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Crutice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systems Parasitology*, v. 56, p. 169-172, 2003.
- MWANGI, E. N.; HASSAN, S. M.; KAAAYA, G. P.; ESSUMAN, S. The impact of *Ixodiphagus hookeri*, a tickparasitoid, on *Amblyomma variegatum*(Acari : Ixodidae) in a field trial in Kenya. *Experimental and Applied Acarology*, v.21, p117–126,1997.
- NASSAJI, M.; GHORBANI, R. Plasma lipid levels in patients with acute bacterial infections. *Turkish Journal of Medical Sciences*, v 42, 465-469,2012.
- NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, p.548-572, 2000.
- NISHIKAWA, Y.; QUITTAT, F.; STEDMAN, T.T.; VOELKER, D.R.; CHOI, J.Y.; ZAHN, M.; YANG, M.; PYPART, M.; JOINER, K.A.; COPPENS, I. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cellular Microbiology*, v. 7, p.849–867, 2005)
- NOLAN, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v. 18, p. 155–166, 1985.
- NUÑEZ, J.L.; MUÑOZ-COBENAS, M.E.; MOLTEDO, H.L. *Boophilus microplus la garrapata comum del ganado vacuno*. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1. ed., 1982. 184p.
- OBENCHAIN, F.D.; OLIVER, J.H. JR. A qualitative analysis of the form, function and interrelationships of fat body and associated tissues in adult ticks (Acari-Ixodoidea). *Journal of Experimental Zoology*, v. 186, n. 3,p. 217-36, 1973.
- OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M.; FREITAS, A.R. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 24, p. 1267-1271, 1989.
- OLSEN, J.V.; BLAGOEV, B.;GNAD, F.; MACEK,B.; KUMAR, C.; MORTENSEN, P.; MANN, M. Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*, v. 127, p. 635–648, 2006.

ONOFRE S.B., MINIUIK, C.M., de BARROS, N.M., AZEVEDO, J.L.. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, p. 1478–1480, 2001.

PARK, D.W.; SHAONING, J.; TADIE, J.M.; STIGLER, W.S.; YONG, G.; DESHANE, J.; ABRAHAM, E.; ZMIJEWSKI, J.W. Activation of AMPK Enhances Neutrophil Chemotaxis and Bacterial Killing. *Molecular Medicine*, v. 19, p. 387–398, 2013.

PATARROYO, J.H.; COSTA, J.O. Susceptibility of Brazilian samples of *Boophilus microplus* to organophosphorus acaricides. *Tropical Animal Health and Production*, v.12, p. 6–10, 1980.

PENNA, V. M. *Boophilus microplus: a resistência genética do hospedeiro como forma de controle*. Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 1990. 65p.

PEREIRA, M. C. *Boophilus microplus: revisão taxonômica e morfológica*. Rio de Janeiro: Químio Divisão Veterinária, 1982. 167p.

PEREIRA, A.A. *Aspectos ecológicos de Boophilus microplus (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae) no município de Franca, nordeste de São Paulo*. 2008, 113p., Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

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

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; GOLO, P. S.; CAMARGO, M. G.; QUINELATO, S.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; BEYS da SILVA, W.O.; SALLES, C.M.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae) Pr1 activity: Biochemical marker of fungal virulence in (Acari: Ixodidae). *Biocontrol Science and Technology*, v. 24, p. 123-132, 2013.

PIPER, E.K.; JACKSON, L.A.; BAGNAL, N.H.; KONGSUWAN, K.K.; LEW, A.E.; JONSSON, N.N. Gene expression in the skin of *Bos Taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 126, p.110–119, 2008.

POHL, P.C.; KLAFFKE, G.M., RECK, J.; MARTINS, J.R.; VAZ-JUNIOR, I.S.; MASUDA, A. ABC transporters as a multidrug detoxification mechanism in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitology Research*, v.111. p.2345–2351, 2012.

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

POURSEYED, S.H.;TAVASSOLI, M.; BERNOUSI,I; MARDANI, K. *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales): An effective alternative to chemical acaricides against

different developmental stages of fowl tick *Argas persicus* (Acari: Argasidae). *Veterinary Parasitology*, v. 172, p.305–310, 2010.

QUINELATO, S. ; GOLO, P.S. ; PERINOTTO, W.M.S. ; SÁ, F.A. ; CAMARGO, M.G. ; ANGELO, I.C. ; MORAES, A.M.L. ; BITTENCOURT, V.R.E.P. . Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. *Veterinary Parasitology*, v. 190, p. 556-565, 2012.

RATH, A.C.; WORLEDGE, D.; ANDERSON, G.C.; CARR, C.J. Virulence of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Metarhizium flavoviridae* games and rozsygal and *Beauveria bassiana* (Ballsamo) Vuillemin to *Adoryphorus coulini* (Burmeister) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of the Australian Entomological Society*, v. 34, p. 181-186, 1995.

RECK, J.; MARKS, F. S.; RODRIGUES, R.O.; SOUZA, U.A.; WEBSTER, A.; LEITE, R. C. GONZALES, J.C.; KLAFKE, G.M.; MARTINS, J.C. Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? *Preventive Veterinary Medicine*, v.113, p.59– 62, 2014.

REZENDE, S.R.F. *Receptores de membrana na resposta imune do carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus após infecção artificial com fungos entomopatogênicos*.2013, 84p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

RIBEIRO, S. P. M. A.; LUNA ALVES-LIMA, E. A.; ASSUNÇÃO, W. T. G. Sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Linhagem PL43) em folhas de cana-de-açúcar. *Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil*, v. 21, p. 59-67, 1992.

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

ROCHA, C. M. B. M. Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus*. *Boletim técnico da UFLA*, n. 32, p. 5-24, 1999.

RODRIGUEZ-VALLE, M.; LEW-TABOR, A; GONDRO, C.; MOOLHUIJZEN, P.; VANCE, M.; GUERRERO, F.D.; BELGARD.; M.; JORGENSEN, W. Comparative microarray analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expression profiles of larvaepre-attachment and feeding adult female stages on *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *BMC Genomics* , v. 10, n. 437, p. 1-32, 2010

ROMBACH, M.C.; HUMBER, A.R.; ROBERTS, D.W. *Metarhizium flavoride* var. *minus* var. nov., a pathogen of plant and leafhoppers on rice in Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon*, v. 27, p. 87-92, 1986.

ROSKOSKI JR, R. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 417, p. 5–10, 2012.

RUDERMAN, N.B.; XU, X.J.; NELSON, L; CACICEDO, J.M.; SAHA, A.K.; LAN, F.; IDO, Y. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 298, p.751-760, 2010.

- RUIZ, J.I.; OCHOA, B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. *Journal of Lipid Research*, v. 38, p.1482–1489, 1997.
- RYDEN, M.; ARVIDSSON, E.; BLOMQUIST, L.; PERBECK L.; DICKER, A.; ARNER, P. Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.318, p. 168–175, 2004.
- SAMISH, M.; GINDIN, G.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), *Journal of Parasitology*, v. 87, p. 1355-1359, 2001.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. FEP MVZ Editora, Belo horizonte, MG, 2007. 264p.
- SANTI, L.; SILVA, O.B.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J.A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, v.55,p.874–880, 2010b.
- SANTI, L.; SILVA, O.B.; PINTO, A.F.M.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* host–pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biology*, v.114, p. 312–319, 2010a.
- SANZ, P.; RUBIO, T.; GARCIA-GIMENO, M.A. AMPK β subunits: more than just a scaffold in the formation of AMPK complex. *FEBS Journal*, v. 280, p. 3723–3733, 2013
- SCHOLTE, E.J.; NG'HABI, K.; KIHONDA, J.; TAKKEN, W.; PAAIJMANS, K.P. ABDULLA, S.; KILLEEN, G.F.; KNOLS, B.G. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, v. 308, p. 1641–1642, 2005.
- SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, v. 56, p. 1267-1274, 2010.
- SHACKELFORD, D.B.; SHAW, R. J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumor suppression. *Nature Reviews Cancer*, v. 9, p.563–575, 2009.
- SILVA, A.M.; ALENCAR, M.M.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 7, p. 1477-1482, 2010.
- SOBERANES, C.N.; SANTAMARÍA, V.M.; FRAGOSO, S.H.; GARCÍA, V.Z. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Técnica Pecuaria en México* 40, p. 81–92, 2002.
- SONENSHINE, D.E.; ROE, R.M. *Biology of ticks, volume: 1*. 2ed. Oxford: Oxford University Press. 2013.560p.
- SOUZA, E.J; COSTA, G.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; FAGUNDES, A.S. Ação do fungo *Beauveria bassiana* associado a gel polimerizado de celulose no controle do carrapato

Anocentor nitens em teste de campo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, p. 163-169, 2009.

SRISUKCHAYAKUL, P.; WIWAT, C.; PANTUWATANA, S. Studies on the Pathogenesis of the Local Isolates of *Nomurea rileyi* against *Spodoptera litura*. *ScienceAsia*, v.31,p. 273-276, 2005.

STEAR, M. J.; NEWMAN, M. J.; NICHOLAS, F. W.; BROWN, S. C.; HOLROYD, R. G. Tick resistance and the major histocompatibility system. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, v. 62, p. 47-52, 1984.

STEINBERG, G.R.; KEMP, B.E. AMPK in Health and Disease. *Physiological Reviews*, v.89, p.1025-1078, 2009.

STILLER, D.; COAN, M.E. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmiasis. *Veterinary Parasitology*, v. 57, p. 97-108, 1995.

SULLIVAN, J.E.; BROCKLEHURST, K.J.; MARLEY, A.E.; CAREY, F.; CARLING, D.; BERI, R.K. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Letters*, v. 353, p.33-36, 1994.

SUN, M.; REN, Q.; GUAN, G.; LIU, Z.; MA, M.; GOU, H.; CHEN, Z.; LI, Y.; LIU, ; NIU, Q.; YANG, J.; YIN, H.; LUO, J. Virulence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* to the engorged female *Hyalomma anatolicum anatolicum* tick (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v. 180, p. 389-393, 2011.

SUNG, G-H.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J-M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHRESTHRA, B.; SPATAFORA, J.W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, v. 57, p. 5-59, 2007.

SUTHERST, R. W.; WHARTON, R. H., COOK, I. M., SUTHERLAND, I. D., BOURNE, A. S. Long-term population studies on the cattle tick (*Boophilus microplus*) on untreated cattle selected for different levels of tick resistance. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 30, p. 353-368, 1979.

TOWLER, M.C.; HARDIE, G. AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. *Circulation Research*, v.100, p. 328-341, 2007.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. *Transaction of the British Mycological Society*, v. 66, p. 407-411, 1976.

UMEMIYA-SHIRAFUJI, R.; BOLDBAATAR, D.; LIAO, M.; BATTUR, B.; RAHMAN, M.M.; KUBOKI, T.; GALAY, R.L.; TANAKA, T.; FUJISAKI, K. Target of rapamycin (TOR) controls vitellogenesis via activation of the S6 kinase in the fat body of the tick, *Haemaphysalis longicornis*. *International Journal for Parasitology*, v. 42, p. 991-998, 2012.

VIOLLET, B.; HORMAN, S.; LECLERC, J.; LANTIER, L.; FORETZ, M.; BILLAUD, M.; GIRI, S.; ANDREELLI, F. AMPK inhibition in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 45, p. 276-295, 2010.

- WANG, C.; TYPAS, M.A.; BUTT, T.M. Detection and characterization of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, *FEMS Microbiology Letters*, v. 213, p. 251-255, 2002.
- WANG, C.; St. LEGER, R.J. The MAD1 Adhesin of *Metarhizium anisopliae* Links Adhesion with Blastospore Production and Virulence to Insects, and the MAD2 Adhesin Enables Attachment to Plants. *Eukaryotic Cell*, v.6, p. 808–816, 2007.
- WHARTHON, R.H.; UTECH, K.B.W.; TURNER, H.G. Resistance to the cattle tick, *B. microplus*, in a herd of Australian Illawarra Shorthorn cattle: its assessment and herdability. *Australian Journal of Agriculture Research*, v. 21, p. 163-81, 1970.
- WHARTON, R. H. *Ticks with special emphasis on Boophilus microplus*. In: PAL, R.; WHARTON, R. H. Control of arthropods of medical and veterinary importance. New York, Plenum Publishing, 1974, p. 36-52.
- WILSON F.; HUFFAKER C. B. *The philosophy, scope and importance of biological control*. In: HUFFAKER C. B.; MESSENGER P. S. Theory and practice of biological control. Academic Press, New York, 1976. p. 3-15.
- WORTZEL, I.; SEGER, R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & Cancer*, v. 2, p. 195 –209, 2011.
- YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; MINOKOSHI, Y.; ITO, Y.; WAKI, H.; UCHIDA, S.; YAMASHITA, S.; NODA, M.; KITA, S.; UEKI, K.; ETO, K.; AKANUMA, Y.; FROGUEL, P.; FOUFELLE, F.; FERRE, P.; CARLING, D.; KIMURA, S.; NAGAI, R.; KAHN, B.B.; KADOWAKI, T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*, v. 8, p. 1288-1295, 2005.
- YEE, K.L.; WEAVER, V.M.; HAMMER, D.A. Integrin-mediated signalling through the MAPkinase pathway. *IET Systems Biology*, v. 2, p. 8– 15, 2008.
- YEH, L. A.; LEE, K.H.; KIM, K.H. Regulation of Rat Liver Acetyl-coA Carboxylase. Regulation of Phosphorylation and Inactivation of Acetyl-Coa Carboxylase by the Adenylate energy charge. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 255, p. 2308-2314, 1980.
- YIP, H.; RATH, A.C.; KOEN, T.B. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adoryphorus couloni*). *Mycological Research*, v. 96, p. 92-96, 1992.
- ZIEGLER, R.; VAN ANTWERPEN R. Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, p. 264-72, 2006.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, v. 9, p. 553-596, 2007a.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, v. 17, p. 879-920, 2007b.