

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

TESE

**Influência da Microbiota e de Patógenos de Carrapatos na
Ação de Fungos Entomopatogênicos**

Emily Mesquita da Silva

2023



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

**INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA E DE PATÓGENOS DE
CARRAPATO NA AÇÃO DE FUNGOS ENTOOPATOGÊNICOS**

EMILY MESQUITA DA SILVA

Sob a supervisão da Professora
Dr. Patrícia Silva Gôlo

e Co-supervisão das Professorss
Dr. Irene da Silva Coelho
e Dr. Sukanya Narasimhan

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

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2023

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

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

s586i silva, Emily Mesquita da , 1994-
Influência da microbiota e de patógenos de
carrapatos na ação de fungos entomopatogênicos / Emily
Mesquita da silva. - Nova Iguaçu, 2023.
73 f.: il.

Orientadora: Patrícia Silva Gôlo.
Coorientadora: Irene da Silva Coelho.
Coorientadora: Sukanya Narasimhan.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2023.

1. controle biológico. 2. microbiota intestinal. 3.
patógenos transmitidos por carrapatos. I. Gôlo,
Patrícia Silva, 1987-, orient. II. Coelho, Irene da
Silva , 1979-, coorient. III. Narasimhan, Sukanya, -,
coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA ANIMAL



ATA N° 716/2023 - DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)

N° do Protocolo: 23083.010341/2023-11

Seropédica-RJ, 27 de fevereiro de 2023.

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

EMILY MESQUITA DA SILVA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor(a) em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 27/02/2023

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

(Assinado digitalmente em 27/02/2023 13:08)
MARISTELA PECKLE PEIXOTO
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###03488

(Assinado digitalmente em 27/02/2023 16:34)
PATRICIA SILVA GOLO
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###21885

(Assinado digitalmente em 27/02/2023 14:57)
GUILHERME MARCONDES KLAFKE
CPF: ###.###.508-##

(Assinado digitalmente em 27/02/2023 15:56)
PEDRO LAGERBLAD DE OLIVEIRA
CPF: ###.###.627-##

(Assinado digitalmente em 27/02/2023 16:27)
EVERTON KORT KAMP FERNANDES
CPF: ###.###.587-##

*Dedico essa conquista aos meus pais,
José Nildo e Sandra Emília, e aos amigos
e familiares que me apoiaram até aqui.*

*This achievement is dedicated to my parents,
José Nildo and Sandra Emília and to my friends
and family who have supported me until here.*

Agradecimentos

O meu doutorado e todo o meu caminho na pós-graduação é dedicado aos meus pais, Sandra e José. Não há outras pessoas que se sacrificaram e acreditaram mais do que eles. Hoje é tudo para vocês, obrigado! Obrigada à minha família, que nunca perguntou por que escolhi o enigmático e incerto caminho de cientista (e me dão mais credibilidade do que penso que mereço), sei que sempre poderei contar com o apoio de vocês, aconteça o que acontecer. Sou extremamente grata aos meus amigos de infância; observamos o crescimento um do outro com amor e parceria.

Não tenho palavras para agradecer à UFRRJ que me deu mais do que eu jamais imaginei, pessoas que estiveram lado a lado nos altos e baixos. Raissa e Manuela, agradeço por nossa casa, que persiste quando não compartilhamos mais um lugar físico; À família LCM: Ricardo, Caio, Allan, Helen, Vinícius, Tauã, Fabiano, Luisa, Haika. Professoras Isabele e Vânia, nossos encontros e discussões são sempre uma parte significativa do meu desenvolvimento. Ser membro deste laboratório me ensinou muito sobre ética, empatia, paciência e perseverança. Às minhas meninas: Laura, Thaís, Victória, Adriani, Mariana, Amanda e Jéssica, os momentos difíceis da pandemia na pós-graduação, os experimentos noturnos, finais de semana e feriados...eu não estaria aqui escrevendo esta tese sem a nossa cumplicidade, muito obrigada por tudo. Professor Huarrisson, suas ideias, sugestões e contribuições melhoraram muito este trabalho e obrigado por abrir o LASAVE para nós. Obrigado Diogo, pela análise NGS, explicações e muita paciência sobre todo este novo mundo sempre que precisávamos. Zeca, Honofre, Jorge, Igor e todos os colaboradores da W.O.Neitz, sem a atenção e cuidado de vocês com os animais e com nosso laboratório não há pesquisa a ser feita.

Às mulheres inspiradoras que cruzaram meu caminho e me guiaram: Professora Patrícia Golo, obrigada pela mentoria durante esses sete anos, sei que cada conquista foi construída e comemorada em equipe, fazer parte da Equipe Golo estará para sempre em meu coração. Sei que sempre posso contar com você e seus conselhos. Dr. Sukanya Narasimhan, desde nossos primeiros e-mails você demonstrou tanta gentileza, paciência e boa vontade. Obrigado por me receber trabalhando em seu laboratório com sua equipe, me senti muito bem-vinda e não poderia imaginar uma experiência melhor no exterior. Professora Irene Coelho, obrigado por estar sempre disponível sempre que precisávamos (e tínhamos uma nova pergunta sobre NGS).

Durante o estágio em Yale, o laboratório de Erol Fikrig e Sukanya me ofereceram experiências tão boas, obrigado por me receberem. Para Ming, trabalhar com você todos os dias me ensinou muito. Em New Haven tive a sorte de compartilhar momentos incríveis com Lissandra, Quinn, James, Chelsea, Becky e Tram; Sonja e Lisa, minhas amigas alemãs, estar com vocês me fez sentir querida. Eu estava em casa com todos vocês. Minha colega de quarto brasileira em New Haven, Jaqueline, obrigado por tudo que você fez por mim desde o dia em que cheguei.

Este trabalho foi realizado com o apoio da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Brasil e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Financiamento Código 001, obrigado por financiar esta pesquisa.

Biografia

Emily Mesquita da Silva, filha de Sandra Emília de Mesquita da Silva e José Nildo da Silva, nasceu em 28 de outubro de 1994, na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

Em janeiro de 2013 iniciou sua graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo-a em fevereiro de 2017. No período de 2013 a 2014 estagiou no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes. Em 2015, ingressou no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médica Veterinária, como bolsista de iniciação científica da FAPERJ, onde permaneceu até o final de sua graduação. Durante a graduação, participou de eventos científicos e publicou trabalhos em anais de eventos.

Em 2017, foi aprovada no processo seletivo do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, como aluna de mestrado até fevereiro de 2019 sob orientação da professora Patrícia Silva Gôlo. Ainda em 2017, participou de missão de estudos na Universidad Nacional de La Plata, na cidade de La Plata, Argentina. Em 2019, iniciou como aluna de doutoramento no mesmo laboratório sob orientação da Dra. Patrícia Silva Gôlo e da Dra. Irene da Silva Coelho. Em 2021, foi contemplada com bolsa de intercâmbio pela CAPES no programa PDSE da Yale University sob a orientação da Dra. Sukanya Narasimhan. Durante sua vida acadêmica participou e apresentou trabalhos em congressos, simpósios, cursos de aperfeiçoamento e publicou trabalhos em revistas científicas nacionais e internacionais.

RESUMO

SILVA, Emily Mesquita da. **Influência da microbiota e dos patógenos de carrapatos na ação de fungos entomopatogênicos**. 2023. 72p. Tese (doutorado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Estudos acerca do uso de fungos entomopatogênicos no controle biológico de carrapatos demonstram alta eficácia, no entanto não é sabido qual a importância da microbiota desse artrópode na ação fúngica. Além disso, o papel da presença de patógenos transmitidos por carrapatos no momento do tratamento fúngico ainda é desconhecido. Portanto, a presente tese teve como objetivo: avaliar a influência da microbiota de *Rhipicephalus microplus* para sua sobrevivência sob ação de *Metarhizium anisopliae*; avaliar composição e diversidade de bactérias no intestino de *R. microplus* após tratamento com *M. anisopliae*; além de analisar se a administração de antibiótico é compatível com uso de fungos entomopatogênicos. Além disso, utilizando o modelo de *Ixodes scapularis* e *Borrelia burgdorferi* fez-se como objetivo comparar a sobrevivência e ingurgitamento de *I. scapularis* infectado ou não com *B. burgdorferi* após tratamento com *M. anisopliae*; analisar a resposta imune dos grupos citados anteriormente pela expressão da molécula adaptadora *Myd88* em receptores “*Toll-like*”; avaliar a colonização de *B. burgdorferi* em carrapatos tratados ou não com *M. anisopliae* através da expressão do gene *flaB*; investigar a influência da coinfeção de *B. burgdorferi* e *M. anisopliae* na microbiota de *I. scapularis* pela expressão do gene *16S*. Para os testes com *R. microplus*, fêmeas parcialmente ingurgitadas foram retiradas do corpo de um bezerro e alimentadas artificialmente com sangue do mesmo animal. A administração de tetraciclina foi realizada adicionando o antibiótico ao sangue na alimentação, formando assim quatro grupos: fêmeas alimentadas apenas com sangue bovino puro (C) e sangue + tetraciclina (T); e dois outros grupos que receberam a mesma dieta, apenas sangue ou sangue+tetraciclina, porém cada um destes grupos foi tratado topicamente com *M. anisopliae* LCM S04 (F e T+F, respectivamente). Para os estudos com *I. scapularis*, ninfas infectadas ou não com *B. burgdorferi* foram inoculadas com *M. anisopliae* ARSEF 549. Os primeiros ensaios foram realizados avaliando a sobrevivência das ninfas após exposição ao fungo; nos ensaios seguintes as ninfas estiveram em contato com camundongos para se alimentarem *ad libitum*. As ninfas alimentadas foram pesadas e dissecadas, e o RNA dos intestinos foi extraído e transformado em cDNA para análise dos genes. A administração de tetraciclina em fêmeas de *R. microplus* não alterou a sobrevivência dos carrapatos. Ainda, a alteração na microbiota e o uso de antibiótico não prejudicaram a ação fúngica, e ambos os grupos tratados com *M. anisopliae* apresentaram curvas de sobrevivência similares. O grupo (T+F) teve a composição bacteriana com maior diversidade. A inoculação de *M. anisopliae* em *I. scapularis* infectados ou não com *B. burgdorferi* não foi diferente entre si; o ingurgitamento das ninfas de *I. scapularis* não foi afetado pelo tratamento fúngico em carrapatos infectados ou não com *B. burgdorferi*. A expressão relativa do gene *flaB* associado a colonização de *B. burgdorferi* nas ninfas se manteve similar com ou sem tratamento fúngico, ainda entre os mesmos grupos, o número de bactérias através da expressão relativa do gene *16S* não foi alterada após tratamento com *M. anisopliae*; contudo as ninfas infectadas com *B. burgdorferi* apresentaram maior expressão relativa do gene *Myd88*. Assim, os resultados demonstrados aqui reiteram a necessidade de mais estudos relacionados as múltiplas interações entre carrapatos, os patógenos transmitidos por eles e fungos entomopatogênicos, com o objetivo de entender a complexidade para pensar em programas de controle biológico eficientes.

Palavras-chave: controle biológico; microbiota intestinal; patógenos transmitidos por carrapatos

ABSTRACT

SILVA, Emily Mesquita da. **Influence of Tick Microbiota and Tick Pathogens on the Action of Entomopathogenic Fungi** 2023. 72p. Tese (doutorado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Reports on the use of entomopathogenic fungi in the biological control of ticks have shown good efficacy, however the importance of tick's microbiota, including tick-borne pathogens, during fungal infection remains largely unexplored. Therefore, this thesis aimed to evaluate the influence of the microbiota of *Rhipicephalus microplus* on its survival under the action of *Metarhizium anisopliae*; evaluate composition and diversity of bacteria in the gut of *R. microplus* after treatment with *M. anisopliae*; in addition, to analyze whether the administration of antibiotics is compatible with the use of entomopathogenic fungi. Moreover, using the model of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi*, the objective was to compare the survival and engorgement of *I. scapularis* infected or not with *B. burgdorferi* after treatment with *M. anisopliae*; to analyze the immune response of the groups mentioned above by the expression of the *Myd88* adaptor molecule in "Toll-like" receptors; evaluate the colonization of *B. burgdorferi* in ticks treated or not with *M. anisopliae* through expression of the *flaB* gene; to investigate the influence of co-infection of *B. burgdorferi* and *M. anisopliae* in the microbiota of *I. scapularis* by the expression of the *16S* gene. For tests with *R. microplus*, partially engorged females were removed from the body of a calf and artificially fed with blood from the same animal. Tetracycline administration was performed by adding the antibiotic into the blood by the time of feeding, thus forming four groups: females fed only with pure bovine blood (C) and blood+tetracycline (T); and two other groups that received the same diet, only blood or blood + tetracycline, but each of these groups was topically treated with *M. anisopliae* LCM S04 (F and T+F, respectively). For the studies with *I. scapularis*, nymphs infected or not with *B. burgdorferi* were inoculated with *M. anisopliae* ARSEF 549. The first assays were carried out to evaluate the survival of nymphs after exposure to the fungus; in the following tests, the nymphs were in contact with mice to feed ad libitum. The fed nymphs were weighed on the and dissected and the RNA from the guts was extracted and transformed into cDNA for gene expression analysis. Administration of tetracycline to *R. microplus* females did not alter tick survival. Furthermore, the disruption of tick microbiota and the use of antibiotics, did not impair fungal action, and both groups treated with *M. anisopliae* showed similar survival curves. The group T+F had the bacterial composition with the highest diversity. Inoculation of *M. anisopliae* in *I. scapularis* infected or not with *B. burgdorferi* was not different; engorgement of *I. scapularis* nymphs was not affected by fungal treatment in ticks infected or not with *B. burgdorferi*. The relative expression of the *flaB* gene associated with the colonization of *B. burgdorferi* in nymphs remained similar with or without fungal treatment. Still among the same groups, the number of bacteria through the relative expression of the *16S* gene was not altered after treatment with *M. anisopliae*; however, nymphs infected with *B. burgdorferi*, and fungus treated showed a higher relative expression of the *Myd88* gene. Thus, the results shown here reiterate the need for further studies related to the multiple interactions between ticks, tick pathogens and entomopathogenic fungi, with the aim of understanding the complexity and to design efficient biological control programs.

Keywords: Biological control; gut microbiota; tick-borne pathogens

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: *Rhipicephalus microplus* fêmeas ingurgitadas usadas para análise de sobrevivência. Peso da fêmea parcialmente e ingurgitada (g), antes (B.F) e após alimentação (P.F)18

Tabela 2: Métricas de rede das comunidades bacterianas no intestino de carrapatos e no sangue puro de bezerro.....28

CAPÍTULO II

Tabela 1: *Primers* dos genes alvo usados em reações de análise de amplificação quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR).....39

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1:** Representação esquemática do conceito de Patobioma (VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2015) 9
- Figura 2:** Distribuição da microbiota em um artrópode sob ação de um fungo entomopatogênico (BOUCIAS et al., 2018).....10

CAPÍTULO I

- Figura 1:** Esquema demonstrando os quatro grupos estabelecidos para análises de sobrevivência e molecular usando fêmeas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas artificialmente.....19
- Figura 2:** Associação de *Metarhizium anisopliae* e tetraciclina. (A) Sobrevivência de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* após alimentação artificial com sangue, com ou sem tratamento com tetraciclina e *Metarhizium anisopliae* (média e erro padrão). (B) Associação de *M. anisopliae* com tetraciclina em meio de aveia com 21 dias de crescimento. Tratamentos: ctrl – carrapatos não tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); T – carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina. O asterisco indica uma diferença estatística entre ctrl e T+F ($P < 0,05$) pelo teste de Log-Hank.....2121
- Figura 3:** Estrutura e diversidade alfa de comunidades bacterianas em intestinos de *Rhipicephalus microplus* e sangue de bezerro. (A) Análise de diversidade beta da comunidade baseada em PCA, com base na matriz ponderada de distância UniFrac para ASVs, mostrando as diferenças entre os grupos; (B) Contagem de ASVs únicos; (C) índice de diversidade de Shannon, (D) índice de diversidade de Simpson; (E) Coeficiente de igualdade de Pileou. Os pontos indicam a localização exata dos meios. (B a E) Os tratamentos com médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas sobrescritas não diferem entre si pelo teste Tukey HSD ao nível de significância de 5%. Tratamentos: B – amostra de sangue puro do bezerro; ctrl – carrapatos não tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); T – carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina. 23
- Figura 4:** Composição de (A) famílias bacterianas e (B) gêneros predominantes nos intestinos dos carrapatos e no sangue puro do bezerro. As amostras foram agrupadas em dendrogramas de acordo com a distância calculada pelo coeficiente de correlação de Spearman. Tratamentos: B – amostra de sangue puro do bezerro; ctrl – carrapatos não tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); T – carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina.....24
- Figura 5:** Participação relativa da classe bacteriana em cada nicho na rede de acordo com o Método de Classificação Multinomial de Espécies (CLAM). Os valores percentuais dentro das caixas foram calculados em uma escala ASV bruta para cada nicho. As comparações dos tratamentos T (A), T+F (B) e B (C) com o controle foram destacadas devido aos maiores contrastes. As porcentagens baseadas na transformação de $\log (ASV+1)$ estão no eixo vertical entre parênteses. Tratamentos: ctrl - carrapatos não tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; B - amostra de sangue puro do bezerro.26
- Figura 6:** Método de classificação multinomial de espécies (CLAM) para o teste de ocupação de nicho. Os gêneros bacterianos foram mostrados apenas em círculos que se destacaram significativamente em cada habitat. Os generalistas (brancos), especialistas (laranja, azul, verde, rosa e roxo) e raros (cinza) são indicados com seus respectivos percentuais. Os valores percentuais representam a contagem direta de ASV único em cada nicho. (A) T versus ctrl; (B) F versus ctrl; (C) T+F versus ctrl; (D) sangue versus ctrl. Tratamentos: B – amostra de sangue puro do bezerro; ctrl – carrapatos não tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); T – carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; F –

carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina..... 27

Figura 7: Análise de co-ocorrência de rede das comunidades bacterianas nos intestinos de *Rhipicephalus microplus* tratadas ou não com *Metarhizium anisopliae* com base no gene 16S rRNA. Ctrl - carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); Tratamentos: B – amostra de sangue puro do bezerro; ctrl – carrapatos não tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); T – carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina..... 29

CAPÍTULO II

Figura 1: *Ixodes scapularis* alimentando-se em camundongos C3H e coleta de carrapatos em experimentos com *Metarhizium anisopliae*. (A) Ninfas não alimentadas em *I. scapularis* (setas vermelhas) para se fixarem no camundongo; (B) Gaiola equipada durante o experimento para coleta de carrapatos; (C) Ninfas de *I. scapularis* alimentadas após o ingurgitamento (setas vermelhas).39

Figura 2: Diagrama de procedimentos experimentais de *Ixodes scapularis*. 1-Microinjeção de ninfas não alimentadas com suspensão de *M. anisopliae* ou solução aquosa tween para análise de sobrevivência, alimentação e expressão gênica (Bb e ninfas limpas); 2- Experimento de alimentação para avaliar o peso de ingurgitamento de ninfas microinjetadas (Bb e ninfas limpas); 3-Análise de expressão gênica de ninfas microinjetadas infectadas com *B. burgdorferi* após a alimentação (ninfas Bb).....40

Figura 3: Porcentagem de sobrevivência e erro padrão de ninfas de *Ixodes scapularis* tratadas ou não com *Metarhizium anisopliae*. (A) Carrapatos limpos (não infectados com *Borrelia burgdorferi*) e (B) carrapatos Bb (infectados por *B. burgdorferi*). Ctrl clean- Ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01% (grupo controle limpo); Met 10⁸ clean -Ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10⁸ conídios mL⁻¹; Met 10⁶ clean - Ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10⁶ conídios mL⁻¹; Ctrl Bb- Ninfas de *I. scapularis* infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01% (grupo controle de *B. burgdorferi*); Met 10⁶ Bb - Ninfas infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10⁶ conídios mL⁻¹. O asterisco indica uma diferença estatística entre ctrl clean e Met 10⁶ clean (P<0,05) pelo teste de Log-Hank.42

Figura 4: Porcentagem de sobrevivência e erro padrão de ninfas de *Ixodes scapularis* infectadas ou não, com *Borrelia burgdorferi* e tratadas ou não com *Metarhizium anisopliae*. Ctrl clean- ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01%; Met clean- ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10⁶ conídios mL⁻¹; Ctrl Bb- Ninfas infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01; Met Bb- Ninfas infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10⁶ conídios mL⁻¹.43

Figura 5: Peso do ingurgitamento após alimentação de ninfas de *Ixodes scapularis* infectadas ou não com *Borrelia burgdorferi* e tratadas ou não com *Metarhizium anisopliae*. Ctrl clean- ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01%; Met 10⁶ clean- Ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10⁶ conídios mL⁻¹; Ctrl Bb- Ninfas de *I. scapularis* infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01%. Cada ponto de dados representa um carrapato; Met 10⁶ Bb - Ninfas de *I. scapularis* infectadas com *B. burgdorferi* e inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10⁶ conídios mL⁻¹.44

Figure 6: Expressão relativa dos genes 16S rRNA (A), *flab* (B) e *MyD88* (C) após inoculação de *Metarhizium anisopliae* em ninfas de *Ixodes scapularis* infectados com *Borrelia burgdorferi* após alimentação sanguínea e queda. Ctrl Bb- Ninfas infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01%; Met 10⁶ Bb - ninfas de *I. scapularis* infectadas com *B. burgdorferi* e inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10⁶ conídios mL⁻¹; Cada ponto de dados representa um pool de intestino de 2-3 carrapatos. Os asteriscos indicam uma diferença estatística entre ctrl Bb e Met 10⁶ Bb (P<0,05) pelo teste de Mann-Whitney. 45

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 A impotência de Carrapatos para a Saude Pública e Animal	2
2.2 <i>Rhipicephalus microplus</i>	2
2.3 <i>Ixodes scapularis</i>	3
2.4 Fungos Entomopatogênicos no Controle de Carrapatos	4
2.5 Microbioma de Carrapatos	6
2.6 Microbioma de Ártropodes e Fungos Entomopatogênicos	10
2.6.1 Cutícula	10
2.6.2 Intestino	11
CAPÍTULO I	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1.INTRODUÇÃO	15
2.MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Alimentação Artificial de Fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	16
2.2 Suspensão Fúngica de <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
2.3 Bioensaios de Infecção por <i>Rhipicephalus microplus</i> com o Fungo Entomopatogênico <i>M. anisopliae</i>	17
2.4 Dissecção de <i>Rhipicephalus microplus</i> e Extração do DNA Intestinal	19
2.5 Preparação de Biblioteca e Sequenciamento de rRNA 16S	19
2.6 Análise das Sequências	19
2.7 Análises de Bioinformática e Estatísticas	20
3.RESULTADOS	21
3.1 O Tratamento com Antibiótico Tetraciclina Não Afetou a Sobrevivência de <i>Rhipicephalus microplus</i>	21
3.2 Estrutura e Diversidade da Comunidade Bacteriana	22
3.3 Composição da Comunidade Bacteriana	22
3.4 Ocupância de Nichos	25
3.5 Análise de Rede de Co-ocorrência	28
4.DISSCUSSÃO	30
CAPÍTULO II	33
RESUMO	34
ABSTRACT	35

1.INTRODUÇÃO.....	36
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Suspensão Fúngica de <i>Metarhizium anisopliae</i>	37
2.2 Colônia de <i>Ixodes scapularis</i> e infecção experimental com <i>B. burgdorferi</i>	37
2.3 Inoculação de <i>Metarhizium anisopliae</i> e Sobrevivência de <i>I. scapularis</i>	38
2.4 Experimento de Alimentação de <i>Ixodes scapularis</i>	38
2.5 Experimento de Transmissão	38
2.6 Expressão gênica e detecção de níveis de <i>Borrelia burgdorferi</i> no intestino do carrapato após tratamento com <i>Metarhizium</i>	39
2.7 Análises Estatísticas	41
3.RESULTADOS.....	42
3.1 Efeitos da Infecção com Fungo Entomopatogênico na Sobrevivência e Ingurgitamento de <i>Ixodes scapularis</i>	42
3.2 Expressão Relativa dos Genes <i>16S</i> , <i>flaB</i> and <i>Myd88</i> em <i>Ixodes scapularis</i> Infectados com <i>B. burgdorferi</i> Após Tratamento com <i>M. anisopliae</i>	45
4.DISSCUSSÃO.....	46
5.CONCLUSÕES.....	48
6.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
7.REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

O controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos é considerado atualmente um método alternativo de controle para diversas pragas agrícolas; no entanto, o conhecimento sobre as relações entre patógenos, microbiota e fungos ainda precisa ser estabelecido. Nesse cenário, o entendimento dessas interações para carrapatos é muito limitado, uma vez que o desenvolvimento de um produto comercial voltado para carrapatos ainda não é uma realidade na indústria. Os estudos sobre carrapatos e sua microbiota demonstraram a importância desses microrganismos simbióticos, uma vez que são responsáveis pela síntese de nutrientes e funções cruciais na fisiologia dos carrapatos. A microbiota do carrapato também está ligada à modulação de patógenos em relação a reprodução, transmissão e colonização. No entanto, o papel desses microrganismos na ação de fungos entomopatogênicos e como os entomopatógenos moldam a microbiota dos carrapatos não é explorado.

Os carrapatos são uma das maiores preocupações em saúde pública mundial estando envolvidos em importantes ciclos de zoonoses como *Ixodes* spp. na doença de Lyme. Esses artrópodes são conhecidos por causar grandes perdas econômicas, além de serem responsáveis pela transmissão de diversos agentes patogênicos de importância humana e veterinária. Como ectoparasitas hematófagos, a transmissão de patógenos ocorre durante a alimentação sanguínea, e doenças transmitidas por carrapatos são relatadas nas famílias Ixodidae (carrapatos duros) e Argasidae (carrapatos moles). Além disso, a importância da interação entre patógenos, artrópodes e fungos entomopatogênicos ainda não é bem conhecida. Principalmente, para alguns insetos, a espécie e o isolado do fungo parecem ditar se a ação do fungo vai ser positiva ou prejudicar o ciclo de vida do patógeno. Ainda assim, em relação ao tempo da evolução parasito-hospedeiro entre patógenos de artrópodes e seu hospedeiro poder ser um fator crucial, o oposto também pode ser verdadeiro.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo explorar como a infecção fúngica entomopatogênica, após tratamento tópico, desencadeou alterações na comunidade bacteriana intestinal em *R. microplus* e se a interferência na comunidade bacteriana intestinal afeta a suscetibilidade do carrapato a fungos entomopatogênicos; se o tratamento com antibióticos pode afetar a ação do fungo. Adicionalmente, foram avaliados a influência da inoculação do fungo entomopatogênico em *Ixodes scapularis* infectado com *Borrelia burgdorferi* em seu ciclo de vida no que diz respeito à alteração da microbiota, resposta imune e biologia do carrapato.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A impotência de Carrapatos para a Saúde Pública e Animal

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos obrigatórios considerados um dos mais importantes artrópodes responsáveis pela transmissão de patógenos, perdendo apenas para os mosquitos como vetores (KARASUYAMA et al., 2020). Os carrapatos são encontrados em mamíferos, aves, répteis e anfíbios (SONENESHINE; ROE, 2013). Em 2018, Abubakar et al. reportaram mais de 900 espécies de carrapatos classificadas no mundo, sendo apenas o gênero *Ixodes* compreendendo 217 espécies já identificadas (HURTADO; GIRALDO-RÍOS, 2018). Para os seres humanos, os patógenos transmitidos por carrapatos são responsáveis por doenças como a doença de Lyme, febre maculosa das Montanhas Rochosas, anaplasose granulocítica humana e anaplasose monocítica humana. Na pecuária, exemplos de doenças são babesiose, anaplasose, teileriose e erliquiose (SONENESHINE; ROE 2013). Além de serem responsáveis por doenças, esses ectoparasitas também podem causar danos físicos aos seus hospedeiros durante a alimentação sanguínea. Levando em consideração todos esses fatores, as perdas econômicas relacionadas aos carrapatos chegam a 18,7 bilhões de dólares nos EUA (ABUBAKAR et al., 2018), e no Brasil, apenas o carrapato bovino (*Rhipicephalus microplus*) já custava mais de 3 bilhões de dólares anualmente cerca de dez anos atrás (GRISI et al., 2014).

Os custos relacionados aos carrapatos devem-se principalmente ao controle desses artrópodes, pois muitos deles podem sobreviver por longos períodos em condições desfavoráveis. Aspectos da biologia do carrapato como revestimento lipídico na cutícula, controle dos espiráculos respiratórios e excreção de guanina reduzem o desperdício de água, promovendo assim maior tempo de sobrevivência (SONENESHINE; ROE, 2013). *R. microplus* (Acari: Ixodidae) é considerado o carrapato mais amplamente distribuído em áreas tropicais (BARRÉ; UILENBERG, 2010), e é a maior preocupação da pecuária no Brasil como um dos mais importantes produtores de carne bovina do mundo, com sua economia diretamente ligada ao bem-estar do gado (ANDREOTTI et al., 2019).

2.2 *Rhipicephalus microplus*

R. microplus é uma espécie de carrapato de hospedeiro único que parasita, preferencialmente bovinos, mas também pode ocorrer em equinos e ovinos, causando grandes perdas econômicas na pecuária, principalmente devido à transmissão de hemoparasitas responsáveis pela “tristeza parasitária bovina”, como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* (DE LA FUENTE et al., 2008). Esse complexo de doenças causadas por esses patógenos é a maior doença transmitida por carrapatos da indústria (SANTOS et al., 2019). Durante a alimentação sanguínea, uma única fêmea do carrapato pode ingerir grande quantidade de sangue, de 0,5 a 1,0 mL, levando à anemia quando a infestação atinge proporções consideráveis (JONSSON, 2006). Os hábitos alimentares do carrapato também podem resultar em lesões na pele do gado, o que leva a surtos de miíases. Quando os bovinos estão altamente infestados por carrapatos, a probabilidade de miíases por *Cochliomyia hominivorax* é quatro vezes maior quando comparada com uma parasitemia baixa (RECK; et al. 2014). Além disso, feridas causadas por carrapatos reduzem o valor do couro animal para venda (ANDREOTTI et al., 2019). Nesse contexto, as despesas com o controle do carrapato bovino são um caso de interesse.

O controle de *R. microplus* é feito principalmente com acaricidas sintéticos. A ampla utilização desses produtos se deve à facilidade de uso, rápido tempo de resposta e baixo custo

(ABBAS et al., 2014). No entanto, essas características também são a razão pela qual o uso de acaricidas tornou-se uma preocupação. No Brasil, os agricultores têm uma forma acessível de comprá-los e aplicá-los sem a devida fiscalização, levando ao uso indevido e indiscriminado. Devido à aplicação inadequada, agrava-se o surgimento de populações de carrapatos resistentes aos acaricidas sintéticos. Atualmente, existem relatos de cepas de carrapatos de diferentes estados do Brasil simultaneamente resistentes a todas as principais classes de acaricidas disponíveis comercialmente no país (RECK et al., 2014; VILELA et al., 2020; VALSONI et al., 2021; DZEMO; THEKISOE; VUDRIKO, 2022). Dzemo et al. (2022) mostraram que para *R. microplus*, o desenvolvimento de resistência a acaricidas é mais de 60% maior quando comparado a outras espécies.

O ciclo de vida de *R. microplus* inclui duas fases: uma fora do hospedeiro, como fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas não alimentadas; e uma fase parasitária com adultos, larvas e ninfas. Seu ciclo comumente termina em aproximadamente oito semanas se as condições de umidade e temperatura forem altas o suficiente nos trópicos, com a fase não parasitária em torno de 40 dias (SONENESHINE; ROE, 2013). Esse estilo de vida contribui para uma disseminação e propagação mais rápida da população de carrapatos. O controle desses carrapatos é desafiador principalmente devido ao número de carrapatos colocados no ambiente durante o período fora do hospedeiro, sendo que a aplicação de tratamentos de controle de carrapatos é basicamente feita nos animais infestados por meio de técnicas de aspersão (SANTOS et al., 2019). Para aprimorar as metodologias de controle, existem várias etapas que em conjunto são denominadas “controle estratégico”. Essas estratégias compreendem ações baseadas na biologia do carrapato, como a influência de fatores abióticos e densidade populacional; raça animal; e manejo de pastagens (ANDREOTTI et al., 2019). Além disso, além dos métodos convencionais, abordagens alternativas têm sido intensamente estudadas para complementar e apoiar o controle de carrapatos no manejo integrado de carrapatos (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2018).

2.3 *Ixodes scapularis*

Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) é um importante vetor de patógenos humanos e animais. A espécie *I. scapularis* é conhecida como responsável pela transmissão de *Borrelia burgdorferi*, bactéria responsável por aproximadamente 300.000 casos nos EUA (ROSENBERG et al., 2018). Além de *B. burgdorferi*, os carrapatos *I. scapularis* também podem transmitir outras espécies de *Borrelia*, *Babesia sp.*, *Ehrlichia sp.* e *Anaplasma sp.* (KUROKAWA et al., 2020). Preocupação crescente com a saúde pública, *I. scapularis* está se espalhando por diferentes localizações geográficas dos EUA. De 1998 a 2016, *Ixodes spp.* ampliou em 44% o número de municípios onde foram encontrados (EISEN et al., 2016).

Como um carrapato de três hospedeiros, *I. scapularis* faz uma refeição de sangue por estágio, que inclui ovo, larva, ninfa e adultos, e deixa o hospedeiro após cada refeição. Seu ciclo de vida pode durar de 2 a 4 anos (YUVAL; SPIELMAN, 1990; KUROKAWA et al., 2020). Os hospedeiros desse carrapato podem variar entre os estágios; enquanto as larvas e ninfas se alimentam principalmente de pequenos animais, como roedores e pássaros, os adultos são encontrados principalmente em grandes mamíferos, como veados (EISEN; EISEN, 2018; RADOLF et al., 2012). De acordo com o ciclo de vida de *I. scapularis* no curso da doença de Lyme, após as larvas se alimentarem de um hospedeiro reservatório infectado por *B. burgdorferi*, as bactérias são transmitidas transestadialmente. Dessa forma, após a muda, quando uma ninfa infectada vai para o repasto sanguíneo, *B. burgdorferi* é disseminada para outro potencial hospedeiro reservatório, mantendo o ciclo, pois permite que outra geração de carrapatos se alimente e seja infectada por *Borrelia* (RADOLF et al., 2012). Após a muda das ninfas, os adultos irão se alimentar e acasalar em um cervo, que desempenha esta importante

parte do ciclo, porém, não é um hospedeiro competente para *B. burgdorferi* (RADOLF et al., 2012). A doença de Lyme tem sido o principal problema quando se trata de *I. scapularis*. *B. burgdorferi* é transmitida ao homem também por meio da picada de carrapato infectado, mas como hospedeiro acidental (RADOLF et al., 2012). Em seguida, as espiroquetas se replicam na pele humana e após um período que pode variar de dias a semanas, *B. burgdorferi* passa do local da picada para outros tecidos como coração, articulação ou sistema nervoso pela corrente sanguínea ou sistema linfático (HYDE, 2017). As manifestações da doença demoram meses a anos para se manifestar, e os pacientes podem ter neuroborreliose, cardite de Lyme e artrite (HYDE, 2017).

Até o momento, as preocupações em torno de *I. scapularis* incluem a incidência de carrapatos coinfectados, uma vez que o carrapato “black legged” aumentou sua distribuição geográfica, conforme mencionado acima. *I. scapularis* está relacionado a quatro doenças de notificação obrigatória: a conhecida doença de Lyme, anaplasmose, babesiose e doença do vírus Powassan (EISEN; EISEN, 2018). Entre elas, foram relatadas coinfeções com *B. burgdorferi* e *Babesia microti* (DIUK-WASSER et al., 2016). Ainda, de acordo com este levantamento, o surgimento da babesiose está correlacionado com áreas endêmicas para a doença de Lyme. Apesar disso, parece que *B. burgdorferi* diminui a chance de estabelecimento de *B. microti* e, além disso, *B. microti* exibe uma baixa aptidão por demonstrar uma transmissão ruim do hospedeiro para carrapato e transestadial entre larvas para ninfas (MATHER et al., 1990).

Com o objetivo de reduzir o número de carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos, várias abordagens para o manejo integrado de carrapatos foram investigadas e aplicadas ao longo dos últimos anos (STAFFORD et al., 2017). Segundo os autores, as principais estratégias se baseiam em a) medidas de proteção individual (verificação de carrapatos e remoção imediata; uso de repelentes); b) manejo da paisagem/vegetação; c) aplicação de acaricidas sintéticos e biológicos no ambiente visando carrapatos em busca de hospedeiro; d) abordagens direcionadas a roedores e veados (acaricidas tópicos; e) regulador oral de crescimento de carrapatos; e f) redução de veados.

2.4 Fungos Entomopatogênicos no Controle de Carrapatos

Na ciência básica e aplicada, o controle biológico é uma das alternativas mais estudadas para o controle de artrópodes-praga. Segundo o “Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento” (MAPA), somente no Brasil foram registrados cerca de 100 produtos biológicos nos últimos dois anos. Em 2019, 60% dos bioprodutos registrados eram à base de fungos (MASCARIN et al., 2019). O modo de ação dos fungos entomopatogênicos é a principal razão pela qual esses microrganismos são intensamente explorados. Enquanto a maioria dos agentes entomopatogênicos, como bactérias, vírus e a maioria dos nematóides devem ser ingeridos, os fungos são capazes de penetrar através da cutícula dos artrópodes. A princípio, os conídios se fixam na superfície do hospedeiro e depois germinam. Ao final do tubo de germinação, ocorre formação de apressórios e uma estrutura chama de “peg” de penetração será responsável pela entrada do fungo na hemocele do artrópode, via produção de enzimas (proteases, quitinases e lipases) e ação mecânica (ZIMMERMANN, 2007). Uma vez dentro do corpo do hospedeiro, os fungos vão crescer e germinar na forma de blastosporos (corpos de hifais), usando o próprio corpo do hospedeiro como fonte de nutrientes, e junto com uma série de substâncias produzidas como toxinas e metabólitos secundários, levando à morte do artrópode (ZIMMERMANN, 2007).

O controle biológico de carrapatos utilizando fungos entomopatogênicos tem se mostrado um método eficiente em estudos de laboratório, semicampo e de campo

(BEYS-DA-SILVA et al., 2020; MASCARIN et al., 2019). Em 2010 Ojeda-Chi et al. demonstraram controle de 100% das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* 12 dias pós-tratamento em condições de laboratório. O controle de surtos de larvas também foi relatado em experimentos de semi-campo por um isolado nativo de *M. anisopliae*, usando óleo como adjuvante (MESQUITA et al., 2020) e por uma formulação granular de propágulos de *Metarhizium* (MARCIANO et al. 2021). Além disso, também foi testado o tratamento com fungos em animais naturalmente infestados em um estudo de campo (CAMARGO et al., 2016). Até hoje, não há nenhum produto à base de fungo entomopatogênico registrado para controle de carrapatos no Brasil. Porém, resultados positivos foram encontrados com *Rhipicephalus sanguineus* (ALVES et al., 2017) e *R. microplus* (CAMARGO et al. 2014; 2016) utilizando um produto comercializado inicialmente para a cigarrinha *Mahanarva fimbriolata* à base de *Metarhizium* sp. O principal entrave para controle de carrapatos com fungos é a tolerância desses microrganismos a fatores abióticos. Estudos utilizando diferentes tipos de formulação são impulsionados pela necessidade de melhorar a vida de prateleira de bioprodutos futuros e a persistência no meio ambiente (CAMARGO et al., 2016; MARCIANO et al. 2021; MESQUITA et al., 2020). Camargo et al. (2016) demonstraram que ao utilizar um produto comercial à base de *Metarhizium*, o grupo óleo (sem fungo) apresentou resultado semelhante quando comparado ao *Metarhizium* formulado a óleo. Esses autores destacam o efeito deletério de diferentes óleos sobre carrapatos, o que leva à necessidade de maiores investigações quanto às formulações. O gênero *Metarhizium* é considerado o grupo mais importante, estudado e bem caracterizado de inseticidas (ZIMMERMANN, 2007; LOVETT; ST. LEGER, 2015). Por esta razão, o gênero concentra um grande número de relatos. *Metarhizium brunneum* cepa F52 foi testada contra *I. scapularis* com três diferentes métodos de exposição, demonstrando uma atividade patogênica para este carrapato (BHARADWAJ; STAFFORD, 2012). Lorenz et al. (2020) utilizaram uma formulação baseada em encapsulamento de alginato de cálcio para *Metarhizium* spp. e dentro de 10 dias após a exposição, *Metarhizium pemphigi* matou 100% das mifas de *I. ricinus*. Em uma abordagem de manejo integrado de carrapatos, o uso de Met F52 (*M. anisopliae*) e uma armadilha de fipronil para roedores para a remoção de carrapatos reduziram em 90% as chances de coletar *I. ricinus* infectado de camundongos (*Peromyscus leucopus*) (LITTLE et al., 2020).

Sugere-se que a suscetibilidade de insetos e carrapatos a fungos entomopatogênicos seja diferente de acordo com o isolado fúngico e espécie de artrópode (LEEMON; JONSSON 2012), sendo essa diferença também detectada entre espécies de carrapatos (MENT et al., 2020). Várias razões poderiam explicar essa variação intrínseca ao hospedeiro artrópode, como resposta imune (CORREA et al., 2021; FIOROTTI et al., 2022), composição da microbiota e características da cutícula. (KIRKLAND; WESTWOOD; KEYHANI, 2004; MENT et al., 2010).

Em diversos artrópodes, a ação contra fungos patogênicos ocorre por meio de respostas imunes celular e humoral (FIOROTTI et al., 2021b). Além disso, microrganismos patogênicos podem manipular o pH da cutícula do hospedeiro e a hemolinfa no momento da penetração (BOUCIAS et al., 2018) e exibir algumas estratégias para superar a defesa do hospedeiro. *M. anisopliae* pode evadir o sistema imunológico do inseto *Manduca sexta* codificando um revestimento protetor em suas células (WANG; St LEGER, 2006). Ainda assim, estudos sobre imunidade de carrapatos contra infecções fúngicas são limitados. A via JAK/STAT em *Drosophila* é desencadeada após desafio bacteriano ou fúngico. No entanto, esta via é pouco conhecida em carrapatos, embora seja funcional (FOGACA et al., 2021). O reconhecimento fúngico é ativado pela via Toll em *Drosophila*, bem como pelo reconhecimento da parede celular (FOGAÇA et al., 2021). Assim, ambas as vias são

consideradas evolutivamente conservadas em artrópodes (ROSA et al., 2016). Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) também desempenham um papel na resposta do carrapato aos fungos. A AMP Microplusin foi isolada de *R. microplus* (ESTEVEZ et al., 2009) e tem demonstrado ação contra *Cryptococcus neoformans* (SILVA et al., 2011). Em carrapatos, as respostas a fungos entomopatogênicos têm sido atribuídas à mediação celular via hemócitos (FIOROTTI et al., 2019; 2022). Fiorotti et al. (2019) descreveram um efeito citotóxico em hemócitos de *R. microplus* após infecção por *Metarhizium robertsii*. Rosa e cols. (2016) observaram padrões de expressão distintos de componentes da via de sinalização imune de carrapatos em células embrionárias de carrapatos ao comparar a resposta de diferentes microorganismos.

A cutícula pode conter substâncias que desempenham um papel crucial para o reconhecimento fúngico, como aminoácidos livres, peptídeos e/ou compostos antifúngicos que podem influenciar a adesão e a germinação (ZIMMERMANN, 2007; MENT et al., 2012). As propriedades físico-químicas das cutículas do hospedeiro têm sido relatadas como um fator importante para os carrapatos suprimirem fungos entomopatogênicos (GRIZANOVA et al., 2019). O estudo entre dois tipos de *Galleria mellonella* (melânico ou não melânico) revelou que o aumento da quantidade de melanina na cutícula do hospedeiro prejudicou a fixação conidial e a germinação de *Metarhizium brunneum* (GRIZANOVA et al., 2019). Além disso, diferentes estágios de desenvolvimento do fungo podem ser prejudicados pelas defesas do hospedeiro. Para *Dermacentor variabilis*, uma baixa taxa de mortalidade foi demonstrada após o tratamento fúngico (KIRKLAND; WESTWOOD; KEYHANI, 2004). No entanto, a adesão de conídios, germinação e crescimento micelial foram exibidos na superfície cuticular do carrapato, sugerindo inibição no desenvolvimento final do fungo. As primeiras investigações da cutícula de *R. microplus* relataram uma epicutícula mais complexa do que em outros artrópodes (FILSHIE, 1976). Acredita-se que a resposta fúngica a cada composto cuticular artrópode-hospedeiro seja distinta, impactando assim na suscetibilidade do hospedeiro (MENT et al., 2010; 2012; RIBEIRO-SILVA, C.S. et al, 2022). Isso também é corroborado pelo fato de que os carrapatos ixodídeos passam parte de seu ciclo de vida presos a seus hospedeiros (principalmente mamíferos) e, provavelmente durante esse período, estão em contato com os compostos da pele do hospedeiro vertebrado.

2.5 Microbioma de Carrapatos

O trabalho de Cowdry em 1925 identificou diferentes bactérias em órgãos distintos de carrapatos, incluindo células epiteliais intestinais de larvas não alimentadas. Além disso, ele também encontrou bactérias distintas em apenas uma célula (não correlacionadas), sem causar nenhum dano à célula. Juntos a esses resultados, e à medida que as tecnologias moleculares melhoraram e a tecnologia de sequenciamento de alto rendimento foi aplicada em vários estudos, um resultado intrigante foi demonstrado quando os estudos de carrapatos mostraram um microbioma complexo. Um microbioma está relacionado aos microrganismos e seus genes associados, enquanto a menção à composição do táxon é chamada de microbiota (CABEZAS-CRUZ et al., 2018). Segundo Cabezas-Cruz et al. (2018) os pesquisadores acreditavam que a dieta baseada em sangue de carrapatos abrigava uma microbiota menos diversa quando comparada a insetos como *Drosophila melanogaster*, uma vez que essas moscas têm uma fonte maior de alimento. Os autores sugerem que esse resultado esteja associado ao complexo ciclo de vida dos carrapatos e à deficiência nutricional como hematófago obrigatório.

As plataformas de sequenciamento de próxima geração (NGS) executam o sequenciamento em larga escala e permitem que uma amostra de um material genético seja sequenciada como diferentes fragmentos em paralelo (GRADA; WEINBRECHT, 2013). Essa abordagem tornou possível sequenciar um genoma em um dia, sendo chamado de

sequenciamento de alto rendimento. Quando comparado ao sequenciamento Sanger tradicional, o NGS tem um custo-benefício mais elevado. Os estudos de tecnologia de sequenciamento de alto rendimento usam principalmente o DNA do gene 16S ribossomal RNA (16S rRNA) com base no conhecimento da comunidade bacteriana. Segundo Janda e Abbott (2007), esse fato é atribuído a características relacionadas a esse gene, como: a) muito bem conservado entre as bactérias, b) regiões de variabilidade, c) função gênica conservadora ao longo do tempo, e d) gene adequado comprimento para análise. O gene 16S rRNA conta com nove regiões hipervariáveis para estudos, V1-V9 (CABEZAS-CRUZ et al., 2018; WOESE E FOX, 1977), onde V1-V3 foram as mais aplicadas para 454 pirosequenciamentos. Esta plataforma de sequenciamento da Roche estava no início dos estudos NGS, mas descontinuada em 2016 D'Amore et al. (2016). Mais recentemente, a plataforma Illumina Miseq vem liderando as pesquisas de NGS devido a um maior número de sequências alcançadas, e dentro desta ferramenta são utilizadas principalmente as regiões V3-V6 (CABEZAS-CRUZ et al., 2018). Para carrapatos, V1-V4 são os mais comuns (GREAY et al., 2018).

O microbioma dos carrapatos inclui membros de bactérias, fungos, vírus, Archea e protozoários (NARASIMHAN; FIKRIG, 2015). Sua composição pode ser afetada por fatores externos, como condições abióticas (ou seja, temperatura, umidade), regiões geográficas e características do carrapato (ou seja, sexo e estágio) (AGUILAR-DIAZ et al., 2021). É relatado que carrapatos adultos possuem apenas 50% da riqueza larval (NARASIMHAN et al., 2021). Um estudo de Hawlena et al. (2013) relatou o fato de que, para os carrapatos *Dermacentor variabilis* e *Ixodes scapularis*, as espécies de artrópodes têm mais influência na formação da microbiota do carrapato do que seu hospedeiro e o ambiente que está inserido. Além disso, além da transmissão transovariana, a cópula e a fertilização do ovo podem aumentar as bactérias do carrapato, devido ao esperma “infectado” e microrganismos associados no trato genital feminino (AFZELIUS et al., 1989; ANDREOTTI et al., 2011). A carga bacteriana dos carrapatos também pode ser influenciada diretamente pelo comportamento relacionado ao seu “estilo de vida”, sejam eles com um ou mais hospedeiros. Quando os carrapatos têm mais de um hospedeiro durante seu ciclo biológico, eles passam mais tempo no solo durante o período de busca. Além disso, eles estão em contato com diferentes microbiotas do hospedeiro durante a alimentação sanguínea. Alguns estudos corroboram esse fato mostrando um aumento na diversidade do microbioma após alimentação sanguínea em *I. scapularis* (MORENO et al., 2006; NARASIMHAN et al., 2014), *Amblyomma americanum* (HEISE et al., 2010) e *R. microplus* (GUIZZO et al., 2020), porém, para *Ixodes ricinus* o contrário foi reportado. A pele do hospedeiro do carrapato também pode contribuir como fonte de comunidade bacteriana do carrapato (que é abrigada durante a alimentação sanguínea), conforme relatado por estudos com bactérias da pele do hospedeiro em órgãos do carrapato (ANDREOTTI et al., 2011; BONNET et al. 2017).

Para entender o papel do microbioma intestinal na biologia de carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos, tratamentos com antibióticos têm sido usados em hospedeiros vertebrados ou administrados diretamente em carrapatos por meio de alimentação artificial ou injeção (ZHONG; JASINSKAS; BARBOUR, 2007; NARASIMHAN et al., 2014; GUIZZO et al., 2017). Uma estrutura de microbioma atípica com diferentes composições taxonômicas e funções metagenômicas pode ser chamada de disbiose (LEVY et al., 2017). Essa mudança é desencadeada por condições ambientais e do hospedeiro que podem perturbar o ecossistema microbiano. Modelos de estudos têm contribuído para o conhecimento das principais funções derivadas de endossimbiontes em favor de carrapatos. Em *A. americanum*, a administração de tetraciclina ou rifampicina reduziu o número de *Coxiella* sp. e *Rickettsia* sp e por isso as fêmeas de carrapato diminuíram seus “fitness” (ZHONG; JASINSKAS; BARBOUR, 2007).

Os autores relataram maior tempo até a oviposição e menor número de larvas eclodidas e de larvas viáveis após a eclosão, sugerindo um papel dessas bactérias no ciclo desse carrapato. No entanto, de acordo com Guizzo et al., (2017), a administração de tetraciclina e a redução nos níveis de bactérias semelhantes a *Coxiella* em fêmeas de *R. microplus* não afetaram a postura dos ovos ou a eclosão das larvas. Contudo, ovos de fêmeas previamente tratadas com o antibiótico não se desenvolveram após o estágio de metaninfa, indicando uma contribuição deste endossimbionte para o crescimento do carrapato. Para *Ornithodoros moubata*, a eliminação de bactérias *Francisella-like* usando rifampicina impactou a formação do carrapato e reduziu a taxa de emergência de adultos; no entanto, após a administração de vitamina B, esses danos foram restaurados (DURON et al., 2018). Dessa forma, comprovou-se que esta bactéria é responsável pela suplementação nutricional em *O. moubata*.

Um dos endossimbiontes de carrapatos mais frequentemente encontrados é o *Coxiella-like* transmitido “maternalmente”. Nakao et al., (2013). relataram um estudo com sete espécies de carrapatos *Amblyomma variegatum*, *Amblyomma testudinarium*, *Ixodes ovatus*, *Ixodes persulcatus*, *I. ricinus*, *Haemaphysalis formosensis* e *Haemaphysalis longicornis* para caracterizar seu microbioma, e *Coxiella* sp. foi detectado em todas as espécies de carrapatos. Apesar da diversidade de genótipos de *Coxiella* já detectados em carrapatos, até hoje, existem apenas duas espécies identificadas (DURON et al., 2015; ELLIMAN; OWENS, 2020). Duron et al. (2015) investigaram *Coxiella* sp. em 58 espécies de carrapatos (916 espécimes), incluindo *Ornithodoros* spp., e teve resultado positivo para 70% deles. Os autores também indicam que esses endossimbiontes semelhantes a *Coxiella* foram provavelmente os ancestrais do patógeno *Coxiella burnetti*, o agente responsável pela febre Q. Para outras bactérias associadas a carrapatos, ainda há muito a ser revelado, pois podemos encontrar relações de linhagem com patógenos transmitidos por carrapatos também em endossimbiontes semelhantes a *Francisella* e semelhantes a *Rickettsia* no microbioma dos carrapatos (NARASIMHAN; FIKRIG, 2015). Alguns autores acreditam que esses táxons podem ter sido patógenos em primeiro lugar e evoluíram em linhas diferentes posteriormente para se tornar um simbiote. (NODA; MUNDERLOH; KURTTI, 1997; BRENNER et al., 2021). Por outro lado, também existe a possibilidade de um endossimbionte evoluir para um patógeno (WELLER et al., 1998; NARASIMHAN; FIKRIG, 2015).

Em 2014, Vayssier-Taussat et al. cunhou o termo “Patobioma” (Figura 1) para descrever as interações microbianas entre o patógeno e seu ambiente biótico. Segundo os autores, um dos principais objetivos do estudo do patobioma é entender a influência da microbiota no progresso dos agentes patogênicos. Nesse sentido, sugere-se que um papel funcional no microbioma não seja totalmente dependente de um grupo taxonômico, mas diferentes grupos de bactérias podem ter o mesmo papel para um conjunto definido de funções (ESTRADA-PEÑA; CABEZAS-CRUZ; OBREGÓN, 2020), mesmo respondendo a um patógeno transmitido por carrapatos.

Além disso, investigar o papel dos fungos entomopatogênicos e as possíveis implicações de sua ação na transmissão e colonização de patógenos por carrapatos é de grande relevância. Não há registro da influência direta de entomopatógenos em doenças transmitidas por carrapatos, no entanto, estudos sobre táxons de insetos mostram alguns achados interessantes. Relatórios de *Glossina fuscipes fuscipes* (WAMITI et al., 2018), *Anopheles stephensi* (BLANDFORD et al. 2005), *Anopheles gambiae* (FANG et al. 2011) e *Aedes aegypti* (DONG et al., 2012) demonstraram uma deficiência no ciclo de vida de patógenos após exposição a fungos entomopatogênicos. Por outro lado, quando o triatomíneo *Meccus pallidipennis* foi infectado com *Trypanosoma cruzi* e tratado com *M. anisopliae*, a sobrevivência do inseto foi maior quando comparada às duas infecções separadamente (FLORES-VILLEGAS et al., 2019). Dessa forma, as interações entre fungos

entomopatogênicos e um carrapato infectado por patógeno, e outros artrópodes importantes em saúde pública precisam ser examinados, uma vez que a resposta do hospedeiro a ambos os patógenos parece ser específica.

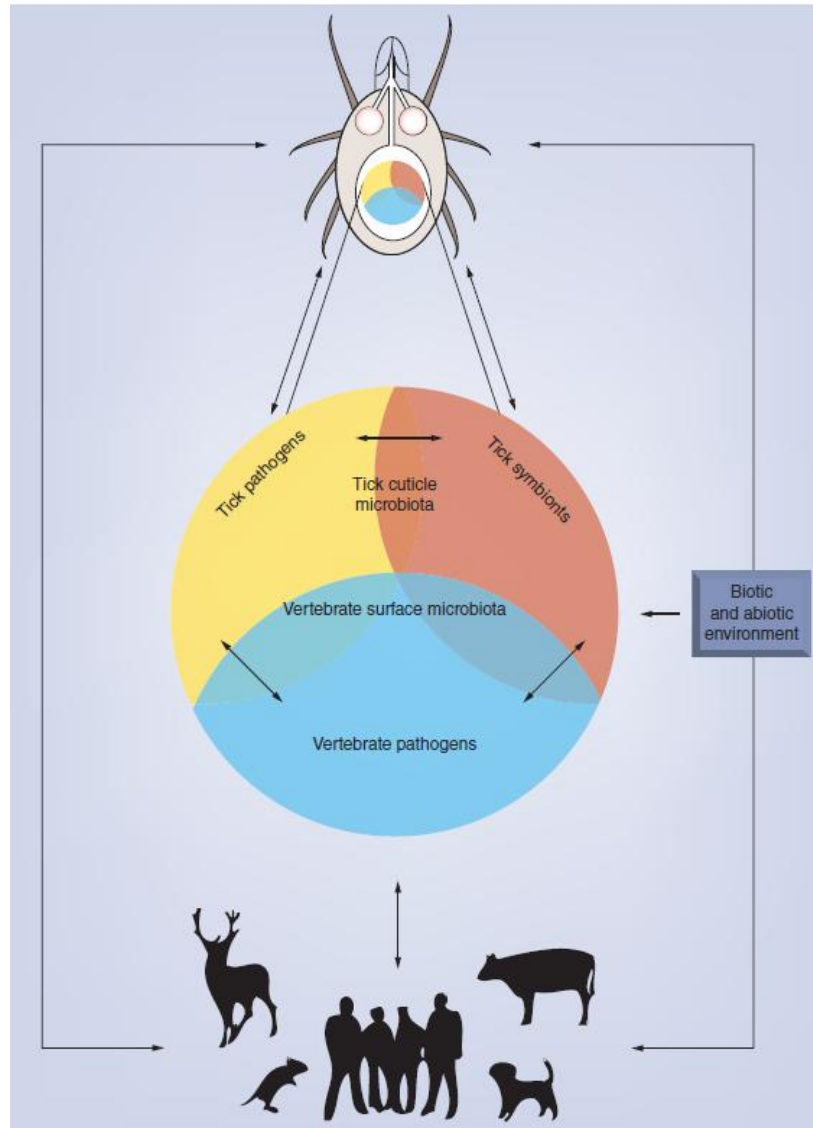


Figura 1: Representação esquemática do conceito de Patobioma (VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2015)

2.6 Microbioma de Ártrópodes e Fungos Entomopatogênicos

O interesse contínuo no microbioma dos artrópodes, seja por características funcionais ou pelo papel nas doenças transmitidas por carrapatos, suscitou a possível influência de endossimbiontes no desenvolvimento de fungos entomopatogênicos. Fungos entomopatogênicos entram em contato com microrganismos de artrópodes na cutícula, no trato intestinal e com endossimbiontes intracelulares (BOUCIAS et al., 2018) (Figura 2). Estudos sobre infecções fúngicas visam principalmente a ação do fungo e interações com o hospedeiro. Ainda assim, a maioria dos relatos publicados foca apenas a comunidade

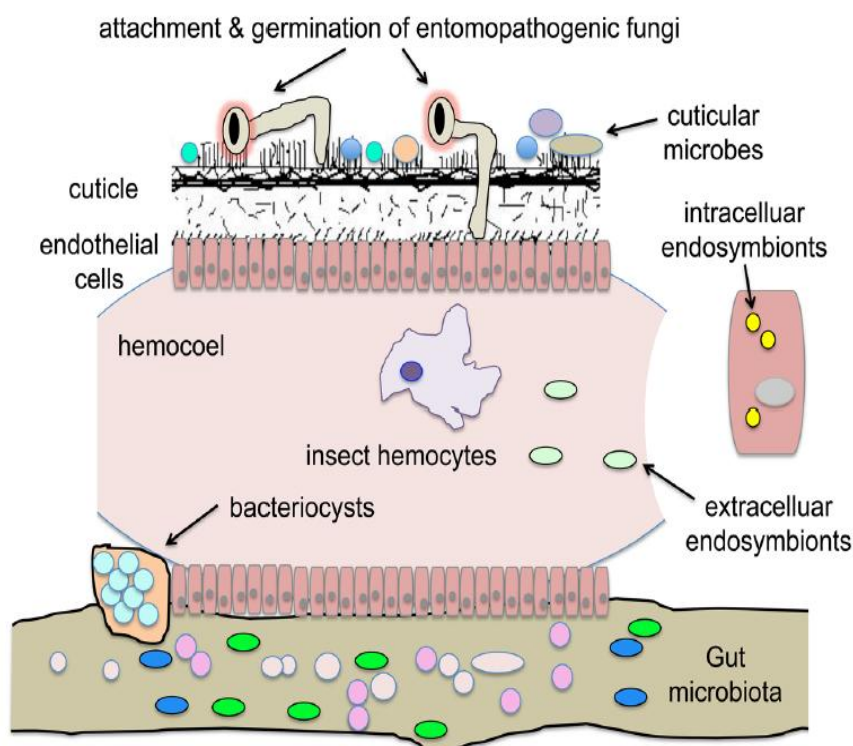


Figura 2: Distribuição da microbiota em um artrópode sob ação de um fungo entomopatogênico (BOUCIAS et al., 2018).

bacteriana.

2.6.1 Cutícula

A cutícula é a primeira barreira física em um artrópode, uma vez que os fungos entomopatogênicos precisam se ligar à epicutícula dos hospedeiros. A epicutícula é uma camada hidrofóbica e esclerotizada e, na maioria dos insetos, abriga um número menor de microrganismos do que no intestino (BOUCIAS et al., 2018). Além dos compostos antifúngicos liberados na cutícula, microrganismos presentes no ambiente onde os artrópodes estão, como solo, plantas e hospedeiros, também podem competir com entomopatógenos atuando como antagonistas (BOUCIAS et al., 2018). No entanto, a epicutícula pode abrigar alguns microrganismos endossimbiontes e esta população de microrganismos já estabelecida na cutícula pode ser uma defesa adicional para o hospedeiro combater patógenos. Relações simbióticas contra patógenos de artrópodes são facilmente demonstradas com o besouro *Dendroctonus frontalis* (SCOTT et al., 2008). Esse inseto abriga uma cepa bacteriana epicuticular, *Streptomyces thermosacchari*, que protege *D. frontalis* do fungo antagonista *Ophiostoma minus* por meio da secreção de uma molécula antifúngica denominada micangimicina (peróxido de polieno). No entanto, esta molécula não inibe o fungo simbiótico

do besouro *Entomocorticiium* sp. (SCOTT et al., 2008). Estudos com diferentes espécies de insetos têm demonstrado o antagonismo de bactérias cuticulares e fungos. Compostos de actinobactérias isolados da formiga *Acromyrmex subterraneus subterraneus* causam a inibição do crescimento de *M. anisopliae* (MATTOSO et al., 2012). Conseqüentemente, a remoção do biofilme bacteriano aumentou a suscetibilidade das formigas a fungos entomopatogênicos. Na mariposa oriental *Grapholita molesta*, verificou-se que a bactéria cuticular dominante *Pantoea* sp. teve um efeito inibitório sobre *Beauveria bassiana* (WANG et al., 2022). Os autores atribuem os mecanismos de *Pantoea* sp. a fatores como a) aspecto físico, pois os conídios podem ser impedidos de aderir; b) competição por nutrientes entre microorganismos; e c) degradação de toxinas de *B. bassiana* por metabólitos de *Pantoea* sp.. A supressão de *B. bassiana* também ocorreu por bactérias da cutícula, principalmente *Bacillus*, isolado da cigarrinha do milho, *Dalbulus maidis* e da cigarrinha *Delphacodes kuchi* (TOLEDO et al., 2011). Embora esses estudos sejam de grande importância para o entendimento da resistência de algumas espécies de artrópodes a fungos entomopatogênicos, é fundamental observar que o nicho ecológico onde ocorre a interação artrópode-fungo e a interação entre espécies desempenha um papel fundamental para indicar se um antagonismo está ocorrendo (BOUCIAS et al., 2018).

2.6.2 Intestino

A literatura sobre as interações microbioma-fungo do artrópode hospedeiro é baseada em insetos, e o resultado dessa interface, seja positiva ou negativa à ação do fungo, parece ser dependente do hospedeiro. A atividade antifúngica que afetou o desenvolvimento de *Beauveria bassiana* foi relatada por uma cepa de *Stenotrophomonas maltiphilia* isolada de larvas da mosca dos estábulos *Stomoxys calcitrans* (MORAES et al., 2014). Investigações do microbioma intestinal com extratos fecais do cupim (*Coptotermes formosanus*) demonstraram o comprometimento do desenvolvimento fúngico devido à presença de um *Streptomyces* sp. (CHOUVENC et al., 2013). Fungos entomopatogênicos também são sugeridos para desencadear alterações no corpo do hospedeiro. *Aedes aegypti* teve a carga bacteriana do intestino médio aumentada após infecção por *Beauveria* spp., mas o estudo não indicou diferença na composição microbiana (RAMIREZ et al., 2018). Wei et al. (2017) relataram que os danos causados por *B. bassiana* no intestino de *Anopheles stephensi* podem ter alterado a fisiologia do inseto levando à disbiose e, portanto, induzindo a translocação de microrganismos intestinais para a hemocele. Esses autores mostraram que *B. bassiana* teve um desempenho melhor quando a microbiota intestinal normal de *A. stephensi* foi preservada do que em mosquitos axênicos. Esse resultado também foi encontrado com o besouro *Dendroctonus valens*, onde as larvas de besouros não axênicos morreram mais rapidamente após o tratamento com *B. bassiana* (XU et al., 2019). Por outro lado, quando a barata, *Blattella germanica*, com microbiota presente foi tratada com *M. anisopliae*, a mortalidade foi maior que a convencional (ZHANG et al., 2019). Da mesma forma, Zhou et al. (2021) relataram o impacto negativo da microbiota de *Delia antiqua* quando bactérias isoladas dessa mosca foram capazes de inibir a germinação de conídios de *B. bassiana*. Numa abordagem integrada, Chao et al. (2020) observaram como o intestino médio da barata *B. germanica* se moldava quando em contato com o inseticida Hydramethylnon e *M. anisopliae*. Tanto o Hydramethylnon sozinho quanto a combinação do fungo com inseticida alteraram significativamente a abundância relativa de táxons bacterianos quando comparados ao controle. No entanto, *M. anisopliae* sozinho teve apenas uma leve modificação. Embora seja possível encontrar vários relatos sobre interações entre fungos entomopatogênicos e microbiota de insetos, não há pesquisas sobre interações entre microbiota de carrapatos e entomopatógenos.

CAPÍTULO I

TRATAMENTO COM *Metarhizium anisopliae* MODIFICA A DIVERSIDADE BACTERIANA DO INTESTINO DO CARRAPTO *Rhipicephalus microplus*

RESUMO

Os carrapatos são parasitos hematófagos obrigatórios responsáveis por grandes perdas econômicas além de preocupações com a saúde humana e animal, principalmente devido à transmissão de patógenos. Fungos entomopatogênicos têm sido intensamente estudados como alternativa e possível aliado aos acaricidas sintéticos no controle integrado de carrapatos. O presente estudo teve como objetivo investigar como a comunidade bacteriana e possíveis patógenos de *Rhipicephalus microplus* são influenciados pelo tratamento com fungo *Metarhizium anisopliae*; a susceptibilidade do carrapato ao fungo após alteração na microbiota bacteriana intestinal e a compatibilidade de *M. anisopliae* com tetraciclina. Fêmeas de *R. microplus* parcialmente ingurgitadas foram alimentadas artificialmente com sangue bovino puro (Ctrl); sangue mais tetraciclina (T); sangue bovino puro + tratamento tópico com *M. anisopliae* (F) sangue com tetraciclina+ tratamento tópico com *M. anisopliae* (T+F); o tratamento fúngico foi realizado topicamente com *M. anisopliae*. Os intestinos de *R. microplus* foram dissecados, o DNA genômico foi extraído três dias após o tratamento fúngico e a região variável V3-V4 do gene *16S* rRNA bacteriano foi amplificada. O intestino dos carrapatos que não receberam o antibiótico e foram tratados com *M. anisopliae* (F) apresentou metade da diversidade bacteriana quando comparada com o ctrl e maior ocorrência de *Coxiella* spp. O índice de diversidade de Simpson e o coeficiente de equabilidade de Pileou foram maiores na comunidade bacteriana do intestino de *R. microplus* que foram alimentados com tetraciclina e tratados com fungo (T+F). Os carrapatos dos grupos tratados com fungo (com ou sem tetraciclina) apresentaram taxa de sobrevivência de 2% enquanto para fêmeas não tratadas foi 85%. A alimentação prévia dos carrapatos com o antibiótico não alterou sua suscetibilidade ao fungo, sugerindo que a ação micoacaricida não será afetada se o bezerro estiver sob antibioticoterapia. *Ehrlichia* spp. foi detectada apenas no intestino do grupo ctrl, apoiando a hipótese de que a mudança na microbiota desse carrapato pelo tratamento com fungos entomopatogênicos ou antibióticos podem afetar o ciclo de vida de patógenos transmitidos por carrapatos. Este é o primeiro relato do efeito de um fungo entomopatogênico na microbiota intestinal do carrapato.

Palavras-chave: controle biológico, comunidade bacteriana, *Metarhizium anisopliae*, *16S* rRNA.

ABSTRACT

Ticks are obligate blood-sucking parasites responsible for significant economic losses and concerns with human and animal health, mainly due to the transmission of pathogens. Entomopathogenic fungi have been intensively studied as an alternative and possible ally to synthetic acaricides in the integrated control of ticks. The present study investigated how the gut bacterial community and potential pathogens of *Rhipicephalus microplus* are shaped after *Metarhizium anisopliae* treatment; the tick susceptibility to the fungus following disruption of the gut microbiota and *M. anisopliae* viability with tetracycline. Partially engorged *R. microplus* females were artificially fed with pure bovine blood (Ctrl), or blood plus tetracycline (T) pure bovine blood + *M. anisopliae* topically treatment (F) blood with tetracycline + *M. anisopliae* topically treatment (T+F). The guts of *R. microplus* were dissected, the genomic DNA was extracted three days after the treatment and the V3-V4 variable region of the bacterial *16S* rRNA gene was amplified. The gut of ticks that did not receive the antibiotic and were treated with *M. anisopliae* (F) exhibited half the bacterial diversity when compared to ctrl and a higher occurrence of *Coxiella* spp. Simpson diversity index and Pielou equability coefficient were higher in the bacterial community of the guts when *R. microplus* were fed with tetracycline and fungus treated. Ticks from fungus-treated groups (with or without tetracycline) exhibited survival rate of 2% while for untreated females it was 85%. Feeding ticks previously with the antibiotic did not change their susceptibility to the fungus, suggesting that the mycoacaricide action will not be impacted if the calf is under antibiotic therapy. *Ehrlichia* spp. was only detected in the gut of ctrl group, supporting the hypothesis tick microbiota disruption-by entomopathogenic fungi or antibiotic treatment- can affect the life cycle of tick-borne pathogens. This is the first report of the entomopathogenic fungus effect on the tick-gut microbiota.

Keywords: biological control, bacterial community, *Metarhizium anisopliae*, *16S* rRNA.

1. INTRODUÇÃO

As relações entre carrapatos e seus microrganismos endossimbiontes têm sido alvo de diversos grupos de pesquisa (GALL et al., 2016; SWEI et al., 2017). Esses microrganismos simbiossiontes são revelados como fontes valiosas de nutrientes e desempenham funções críticas no ciclo de vida do carrapato. Ainda assim, eles também estão ligados à capacidade vetorial do carrapato. O carrapato do boi, *Rhipicephalus microplus*, é uma espécie de carrapato de hospedeiro único que parasita preferencialmente bovinos e é capaz de transmitir espécies de *Babesia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia* e *Theileria* na pecuária e pode ser encontrado em áreas de clima tropical (DELA FUENTE et al., 2008). Além disso, os hábitos alimentares do carrapato resultam em feridas na pele levando a preocupações secundárias, como moscas da bicheira (GRISI et al., 2014).

Até hoje, o controle do carrapato é baseado em acaricidas sintéticos, mas o uso inadequado desses produtos ocasiona diversos problemas como a seleção de populações de carrapatos resistentes, intoxicação para humanos e animais e contaminação de alimentos através de resíduos (FULAR et al., 2018; RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2017). Assim, até o momento, a maioria das classes químicas disponíveis comercialmente no Brasil apresentam relatos de resistência. O fungo entomopatogênico *Metarhizium* é um dos bioinseticidas mais explorados e consolidados na agricultura, com potencial para ser utilizado comercialmente no controle de carrapatos. Dessa forma, com base no sucesso da abordagem de controle biológico na agricultura, diversos estudos vêm demonstrando resultados avançados para o controle de carrapatos utilizando fungos entomopatogênicos já em aplicações de campo (CAMARGO, et al., 2014; 2016; MESQUITA et al., 2020; BERNARDO et al., 2018; FIOROTTI et al., 2018). No entanto, sugere-se que os carrapatos sejam menos suscetíveis a fungos entomopatogênicos do que os insetos, uma vez que estes requerem menores concentrações de fungos para serem mortos. As razões para essa diferença podem estar ligadas as características do hospedeiro como composição da cutícula, resposta imune e a influência da microbiota do artrópode.

Sabe-se que comunidade de microrganismos estabelecida, principalmente no nível bacteriano, está possivelmente ligada à eficiência da ação fúngica entomopatogênica (BOUCIAS et al., 2018). A interferência na comunidade bacteriana em diferentes espécies mostrou esse padrão para vários insetos. Microrganismos simbiossiontes podem ser encontrados na cutícula dos artrópodes, no interior do corpo através dos órgãos e dentro das células. Alguns táxons bacterianos podem sintetizar compostos antifúngicos que podem prejudicar o desenvolvimento fúngico, seja na primeira etapa da infecção fúngica da cutícula ou posteriormente, quando o entomopatógeno já estiver dentro da hemocele. Embora as pesquisas sobre microbiota de insetos e patógenos fúngicos estejam avançando continuamente, a literatura relacionada a carrapatos é inexplorada. Por exemplo, o que se sabe sobre as interações do microbioma de carrapatos está relacionado principalmente à sua fisiologia e aos impactos na biologia das doenças transmitidas por carrapatos, portanto, muito resta a ser examinado.

Este capítulo teve como objetivo explorar como o tratamento tópico de *M. anisopliae* provoca modificação da comunidade bacteriana intestinal em *R. microplus* e se a interferência na estrutura bacteriana intestinal usando o antibiótico tetraciclina afeta a suscetibilidade do carrapato a fungos entomopatogênicos, a sobrevivência do carrapato e ação fúngica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Alimentação Artificial de Fêmeas de *Rhipicephalus microplus*

Um bezerro foi infestado artificialmente com larvas de *Rhipicephalus microplus* e mantido na Estação de Pesquisa Parasitológica Wilhemn Otto Daniel Neitz (W.O. Neitz) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Departamento de Parasitologia Animal, Brasil (CEUA / Instituto Veterinário, UFRRJ - protocolo nº 9714220419). Análises e experimentos adicionais foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz.

A alimentação artificial de *R. microplus* foi adaptada de Valim et al. (2017) e Ribeiro et al. (2014). Os carrapatos se alimentaram naturalmente no bezerro por 19 ou 20 dias e, em seguida, as fêmeas parcialmente ingurgitadas de aproximadamente 40-70 mg foram cuidadosamente removidas da pele do hospedeiro (para evitar a ruptura das peças bucais). As fêmeas foram pesadas, esterilizadas com hipoclorito de sódio (0,05% v/v) por três minutos, lavadas e secas com papel toalha. A média \pm erro padrão do peso das fêmeas parcialmente ingurgitadas removidas do bezerro foi de $0,059 \pm 0,002$. O sangue utilizado para alimentar artificialmente os carrapatos foi coletado diretamente da veia jugular do mesmo bezerro (CEUA/Instituto Veterinário, UFRRJ - protocolo nº 6407270619) onde os carrapatos foram alimentados naturalmente, através de um sistema de vácuo em um tubo de 3,6 mL contendo citrato como anticoagulante (Vacuplast, Turquia). As fêmeas foram alimentadas artificialmente com sangue puro ou sangue mais cloridrato de tetraciclina (Merck, Darmstadt, DE) à 0,05 mg/mL por sete horas usando ponteirs de plástico estéreis. A concentração de tetraciclina foi estabelecida de acordo com um estudo anterior (GUIZZO et al., 2017). As pontas foram posicionadas nos palpos e quelíceras dos carrapatos, em seguida colocadas em bandeja de isopor e mantidas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\geq 80\%$ de Umidade Relativa (UR). As ponteiras foram preenchidas individualmente com sangue (até 50 μL) a cada hora, de acordo com a necessidade e verificadas para remoção de sangue seco. As fêmeas parcialmente ingurgitadas foram oferecidas com uma média de 350 μL de sangue. Os carrapatos foram pesados individualmente antes e após a alimentação artificial para medir a ingestão de sangue. Apenas os carrapatos que dobraram seu peso inicial foram considerados para análise posterior (0,03 μg de tetraciclina mg⁻¹ peso da fêmea) (GUIZZO et al., 2017).

2.2 Suspensão Fúngica de *Metarhizium anisopliae*

O isolado fúngico *Metarhizium anisopliae* sensu stricto LCM S04 (MESQUITA et al., 2020) foi utilizado no presente estudo. LCM S04 é um isolado nativo coletado do solo de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. As culturas foram cultivadas em meio de aveia sob condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$; $\geq 80\%$ UR) por 21 dias. Os conídios foram suspensos em solução de água destilada estéril com monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80[®]) 0,01% (v/v) a 1×10^8 conídios mL⁻¹. A viabilidade fúngica foi avaliada por plaqueamento de uma alíquota de 20 μL de 1×10^5 conídios mL⁻¹ da mesma suspensão fúngica em batata dextrose agar (PDA). A germinação dos conídios foi determinada 24h após a incubação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ usando um microscópio óptico (400 \times) (E200; Nikon, Tóquio, Japão). Um mínimo de 300 conídios foi avaliado e a porcentagem de germinação foi calculada. As suspensões fúngicas utilizadas nos experimentos tiveram uma viabilidade de pelo menos 95%. Como o presente estudo acessou o patrimônio genético brasileiro, a pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen) sob o código AA47CB6. Para garantir a compatibilidade entre *M. anisopliae* LCM

S04 e Tetraciclina, foi realizado um teste de viabilidade para verificar a germinação dos conídios conforme descrito acima. Os conídios foram espalhados no PDA mais o antibiótico (mesma concentração do sangue). LCM S04 também foi cultivado em meio de aveia mais tetraciclina a $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR $\geq 80\%$ por 21 dias para avaliar se a morfologia da colônia do fungo seria alterada.

2.3 Bioensaios de Infecção por *Rhipicephalus microplus* com o Fungo Entomopatogênico *M. anisopliae*

Carrapatos alimentados artificialmente com sangue puro ou sangue mais tetraciclina (seção 2.1) foram tratados topicamente com suspensão de *M. anisopliae*. Quatro grupos de aproximadamente 10 fêmeas cada/por experimento foram estabelecidos da seguinte forma: carrapatos não tratados alimentados com sangue puro (grupo controle) (ctrl); carrapatos não tratados alimentados com sangue mais tetraciclina (T); carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (F); carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina (T+F). As fêmeas foram alimentadas e ao final da alimentação artificial, os carrapatos foram lavados em água corrente para remover sangue residual, secos e pesados. Em seguida, os carrapatos que dobraram de peso foram tratados topicamente com 20 μL de 1×10^8 conídios mL^{-1} (para grupos tratados com fungos) e incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$; $\geq 80\%$ UR. As fêmeas utilizadas em cada grupo são apresentadas na Tabela 1, com peso de 33,2 a 71,2 mg (0,0332g a 0,0712g). O peso das fêmeas dos carrapatos pós alimentação artificial teve distribuição homogênea entre todos os grupos. Portanto, a quantidade de sangue ingerida não interferiria em análises posteriores. Após 72h de tratamento com o fungo, três fêmeas de cada grupo tiveram seus intestinos dissecados para extração de DNA. Os demais carrapatos tiveram sua sobrevivência registrada diariamente durante 15 dias. Este bioensaio foi realizado três vezes com novos lotes de conídios e carrapatos *R. microplus*.

Tabela 1: *Rhipicephalus microplus* fêmeas ingurgitadas usadas para análise de sobrevivência. Peso da fêmea parcialmente e ingurgitada (g), antes (B.F) e após alimentação (P.F)

Ctrl		Tetraciclina		Fungo		Fungo + Tetraciclina	
Peso B. F	Peso P. F	Peso B. F	Peso P. F	Peso B. F	Peso P. F	Peso B. F	Peso P. F
0,0439	0,0822	0,0576	0,1112	0,0387	0,0797	0,0387	0,0735
0,0568	0,1108	0,0527	0,1013	0,0712	0,1381	0,0535	0,1082
0,0496	0,1247	0,0563	0,115	0,0584	0,1106	0,058	0,1242
0,0469	0,112	0,0525	0,1123	0,0393	0,0783	0,0439	0,0949
0,0447	0,1015	0,0454	0,1144	0,0515	0,1274	0,0502	0,116
0,0539	0,1052	0,0409	0,0783	0,0447	0,1057	0,0477	0,1175
0,0406	0,0849	0,0431	0,0978	0,0385	0,0743	0,0462	0,1057
0,05	0,108	0,0425	0,0957	0,0528	0,127	0,0492	0,1013
0,0397	0,074	0,0511	0,1173	0,0398	0,0898	0,0478	0,1153
0,0405	0,1313	0,0483	0,1466	0,0405	0,1112	0,0445	0,1142
0,0387	0,0733	0,0448	0,1288	0,056	0,1112	0,0407	0,1129
0,0398	0,1071	0,041	0,1371	0,0461	0,1005	0,0345	0,1012
0,0396	0,0958	0,0567	0,1288	0,0485	0,1276	0,0395	0,0864
0,0643	0,1257	0,0521	0,1179	0,0645	0,1428	0,0511	0,1024
0,0551	0,1492	0,0584	0,1817	0,0711	0,158	0,0475	0,1163
0,042	0,1	0,0347	0,0744	0,0538	0,1109	0,0349	0,0783
0,0447	0,0832	0,0559	0,1091	0,0502	0,0922	0,035	0,0947
0,0415	0,1151	0,052	0,1046	0,0332	0,0723		
0,0524	0,1205			0,0334	0,0972		
0,0489	0,1362			0,0426	0,0813		
0,0475	0,1365						

2.4 Dissecção de *Rhipicephalus microplus* e Extração do DNA Intestinal

Os intestinos de fêmeas de *R. microplus* foram dissecados com pinças estéreis e lâminas usando solução salina tampão fosfato estéril (PBS) (pH 7,2). O tecido dos intestinos foi lavado duas vezes em PBS estéril e posteriormente mantido em RNA Later (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a -80°C até a extração. O DNA genômico foi extraído de um pool de três intestinos por grupo e depois separado em três repetições, conforme esquema da Figura 3. Primeiramente, os intestinos dos carrapatos foram congelados em nitrogênio líquido e maceradas com pistilo estéril. O DNA do homogeneizado intestinal foi extraído seguindo o protocolo do kit DNeasy Blood and Tissue de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) com os seguintes detalhes: (1) duas horas de incubação a 56°C após adição de proteinase K; (2) 50 μL de Tampão AE para eluição de DNA. O DNA do sangue do bezerro (B) utilizado para a alimentação natural e artificial também foi extraído conforme o mesmo protocolo citado acima.

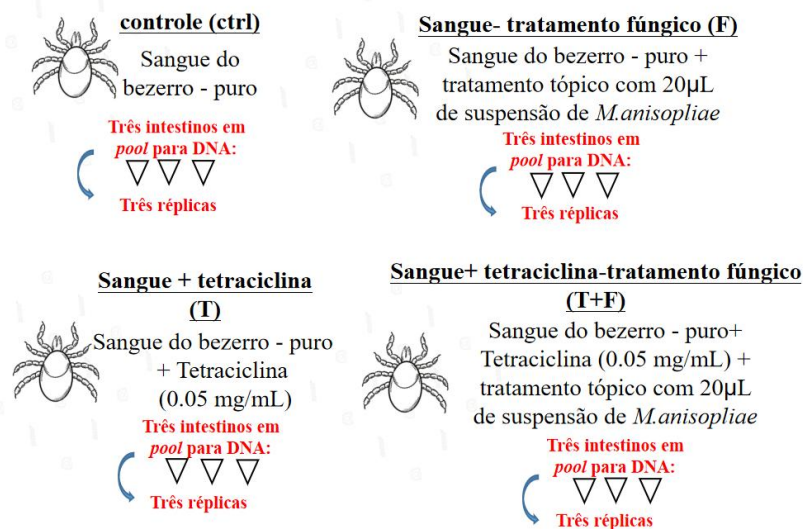


Figura 1: Esquema demonstrando os quatro grupos estabelecidos para análises de sobrevivência e molecular usando fêmeas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas artificialmente.

2.5 Preparação de Biblioteca e Sequenciamento de rRNA 16S

A região variável V3-V4 do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada para DNA genômico de 13 amostras (triplicatas de amostras de intestino combinadas de cada grupo e uma para controle de sangue (B), usando os primers Bakt_341F (5'-CCT ACG GGN GGC WGC AG-3') e Bakt_805R (5'-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3') Herlemann et al. (2011). O Herculanase II Fusion DNA polimerase Nextera XT Index V2 Kit (300 pb paired-end reads) foi usado na plataforma Illumina[®] MiSeq[®] com um pico PhiX de 30% na Macrogen (Seul, Coreia do Sul). O binário de chamadas de base foi convertido no formato FASTQ, as sequências foram desmultiplexadas e os códigos de barras foram removidos pelo pacote bcl2fastq v2.20 (Illumina Inc, San Diego, CA, EUA).

2.6 Análise das Sequências

Os adaptadores foram removidos dos dados brutos (1.250.293 sequências diretas e reversas), que foram então filtrados com base em pontuações de qualidade e cortados usando o pipeline 'DADA2' versão 1.16 (CALLAHAN et al., 2016) em R versão 4.1.1 (R Core Team, 2022) em conjunto com RStudio 1.4.1717 (RStudio Team, 2022). A ferramenta 'FIGARO'

(Weinstein et al., 2019) foi usada para calcular os parâmetros de truncamento otimizados. As leituras direta e reversa foram truncadas em 270 pb e 215 pb, respectivamente. As leituras diretas e reversas com mais de dois erros esperados foram descartadas, respectivamente, e as leituras foram truncadas na primeira instância de um índice de qualidade ≤ 2 . As taxas de erro das leituras foram aprendidas pela função “learnErrors”, alternando entre estimativa de taxa de erro e inferência de amostra até a convergência. As variantes de sequência amplicon (ASVs) foram inferidas usando a função "dada" e as sequências foram mescladas pela função "mergePairs". As quimeras foram removidas de coleções de sequências únicas pelo método de consenso entre amostras usando a função “removeBimeraDenovo”. As atribuições taxonômicas T foram dadas com base no “Silva SSU132-modified database” (QUAST et al., 2013), usando a função “IdTaxa” do pacote 'DECIPHER' v 2.20 R (WRIGHT, 2016), um método com desempenho de classificação que é melhor do que o método classificador bayesiano ingênuo padrão (MURALI et al., 2018). As sequências atribuídas ao genoma mitocondrial, cloroplastos e não bacterianos foram removidas. Após esses procedimentos, 3.313 ASVs foram atribuídos às 839.263 sequências bacterianas restantes para o procedimento de rarefação e análise estatística.

2.7 Análises de Bioinformática e Estatísticas

A curva de sobrevivência dos carrapatos foi analisada pelo teste de Log-rank com nível de significância de 0,05 pelo GraphPad Prism versão 8.4.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). Todas as outras análises estatísticas foram feitas no software R versão 4.1.1 em conjunto com o RStudio 1.4.1717.

Análises exploratórias multivariadas foram feitas usando o pacote R “vegan” versão 2.5-7 (OKSANEN et al., 2020). A beta-diversidade foi estudada com base na análise de coordenadas principais (PCoA) usando a matriz de distância Unifrac ponderada das comunidades microbianas em cada amostra, mostrando diferenças entre comunidades bacterianas de diferentes tratamentos. A predominância de ASVs raros, especialistas e generalistas foi avaliada pelo Método de Classificação Multinomial de Espécies (CLAM) com ajuste para comparações múltiplas, usando o limiar de especialização da supermaioria ($K = 2/3$, $p = 0,05$) (CHAZDON et al. 2011). Os gráficos foram construídos com o pacote ggplot2 R versão 3.3.3 (WICKHAM 2016).

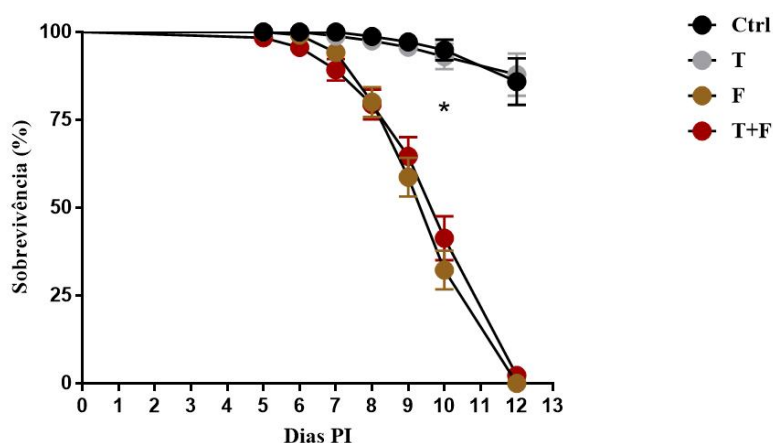
A análise da rede entre ASVs foi avaliada usando estimativas bootstrap de correlação SparCC pelo pacote SpiecEasi R versão 1.1.0, resultando em matrizes de nós e arestas (KURTZ et al., 2015). Apenas arestas com correlações significativas ($p < 0,01$) foram selecionadas para construção gráfica usando o software Gephi versão 0.9.2 (BASTIAN et al., 2009), destacando o número de conexões (grau), centralidade de intermediação (BC) e o sinal de as correlações.

3. RESULTADOS

3.1 O Tratamento com Antibiótico Tetraciclina Não Afetou a Sobrevivência de *Rhipicephalus microplus*

A curva de sobrevivência dos carrapatos no grupo controle foi maior do que os grupos F ($\chi^2 = 81,9$, $P < 0,0001$) e T+F ($\chi^2 = 68,4$, $P < 0,0001$), mas não diferente do T ($\chi^2 = 0,06$, $P = 0,80$). As curvas de sobrevivência F e T+F foram semelhantes ($\chi^2 = 0,5$, $P = 0,47$) (Figura 2A). A maior mortalidade de carrapatos (100%) foi registrada 12 dias após o tratamento com 10^8 conídios de *M. anisopliae* por mL (com ou sem tetraciclina). Quando a tetraciclina foi adicionada ao meio de cultura artificial, a colônia de *M. anisopliae* exibiu morfologia diferente quando comparada ao controle, demonstrando maior crescimento micelial (Figura 2B). A germinação de conídios de *M. anisopliae* não foi afetada pela adição de tetraciclina em BDA, onde a germinação controle foi de $99,3 \pm 0,5\%$ e do grupo tetraciclina $99,5 \pm 0,29\%$ ($P=0,71$).

(A)



(B)

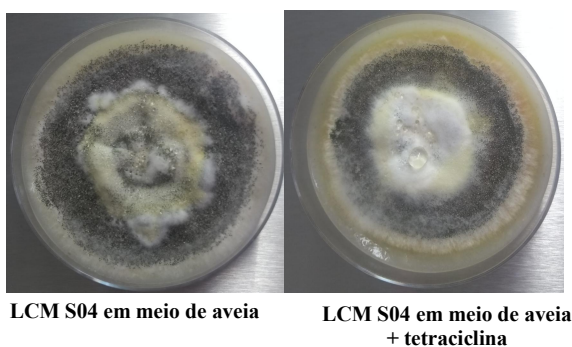


Figura 2: Associação de *Metarhizium anisopliae* e tetraciclina. (A) Sobrevivência de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* após alimentação artificial com sangue, com ou sem tratamento com tetraciclina e *Metarhizium anisopliae* (média e erro padrão). (B) Associação de *M. anisopliae* com tetraciclina em meio de aveia com 21 dias de crescimento. Tratamentos: ctrl – carrapatos não tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); T – carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina. O asterisco indica uma diferença estatística entre ctrl e T+F ($P < 0,05$) pelo teste de Log-Hank.

3.2 Estrutura e Diversidade da Comunidade Bacteriana

A análise de coordenadas principais (PCoA), com base na matriz ponderada de distância UniFrac, explicou cerca de 77% da variância total do modelo multivariado apenas nos dois eixos principais (Figura 3A). Por esse parâmetro, o microbioma intestinal de carrapatos alimentados com tetraciclina e tratados com *M. anisopliae* (T+F) diferiu dos outros nichos. O intestino de carrapatos alimentados com sangue mais tetraciclina sem o tratamento com fungo (T) ou alimentado com sangue puro e tratado com fungo (F) exibiu estruturas de comunidades bacterianas relativamente próximas umas das outras. As comunidades do primeiro grupo (ou seja, T) também foram próximas àquelas observadas no intestino dos carrapatos do grupo controle (ctrl) (carrapatos alimentados com sangue puro). A composição da comunidade bacteriana do sangue do bezerro (B) foi a mais distinta.

Os tratamentos exibiram números médios semelhantes de ASVs bacterianos nas análises da diversidade beta (Figura 3B). De acordo com o resultado do PCoA, o índice de diversidade de Shannon (Figura 3C), a diversidade de Simpson (Figura 3D) e o coeficiente de equabilidade de Pielou (Figura 3E), medidos no intestino de T+F, foram os mais altos e diferiram significativamente daqueles observados nos outros tratamentos, exceto por uma comparação em que T foi semelhante a T+F no índice de Shannon. No geral, F exibiu os menores índices de diversidade bacteriana intestinal, seguido por B, ctrl, T, até atingir o pico em T+F.

3.3 Composição da Comunidade Bacteriana

O perfil taxonômico gerou 839.263 sequências bacterianas filtradas por qualidade classificadas em 3.313 ASVs. A cobertura da classificação dos ASVs nos níveis taxonômicos foi a seguinte: filo (96%), classe (94%), ordem (86%), família (75%), gênero (49%) e espécie (5%). As 19 famílias mais abundantes representaram mais de 80% do total de famílias (Figura 4A). Em todos os tratamentos, a família mais abundante (acima de 2% do total de ASVs) foi Coxiellaceae (43,9% das sequências), seguida de Anaplasmataceae (8,1%), Lachnospiraceae (4,9%), Ruminococcaceae (3,3%), Comamonadaceae (3,0%) e Bacteroidaceae (2,6%).

Seguindo as famílias, os 19 gêneros mais abundantes representaram mais de 80% do total de gêneros (Figura 4B). Os gêneros mais abundantes (acima de 1% do total de ASVs) foram *Coxiella* (43,9%), *Anaplasma* (6,3%), *Bacteroides* (2,6%), *Streptococcus* (1,9%), *Ehrlichia* (1,8%), *Caviibacter* (1,7%), *Eubacterium* (1,5%), *Lactobacillus* (1,1%) e *Pseudomonas* (1,1%). Com exceção de *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp., ambas da família Anaplasmataceae, todos esses gêneros são representantes de diferentes famílias.

De acordo com o coeficiente de correlação de Spearman, corroborando os resultados de PCoA (Figura 3A), as composições das famílias bacterianas (Figura 4A) e gêneros (Figura 4B) no sangue puro do bezerro (B) e no intestino dos carrapatos de T+F diferiram daquelas observadas nos demais tratamentos, principalmente do controle. Enquanto nos demais tratamentos (ou seja, controle, T e F) predominaram bactérias de Coxiellaceae, principalmente *Coxiella* sp. No intestino do grupo T+F houve predominância de espécies de Lachnospiraceae, seguidas por espécies de Comamonadaceae e Ruminococcaceae. Além disso, os dados dos intestinos do tratamento T+F apresentaram um agrupamento de várias outras famílias bacterianas com frequências de ocorrência inferiores a 0,5%. No sangue puro de bezerro (B), Anaplasmataceae (principalmente *Anaplasma* spp.) foi predominante, seguida de Bartonellaceae (principalmente *Bartonella* spp.). (principalmente *Anaplasma* spp.) foi predominante, seguida de Bartonellaceae (principalmente *Bartonella* spp.).

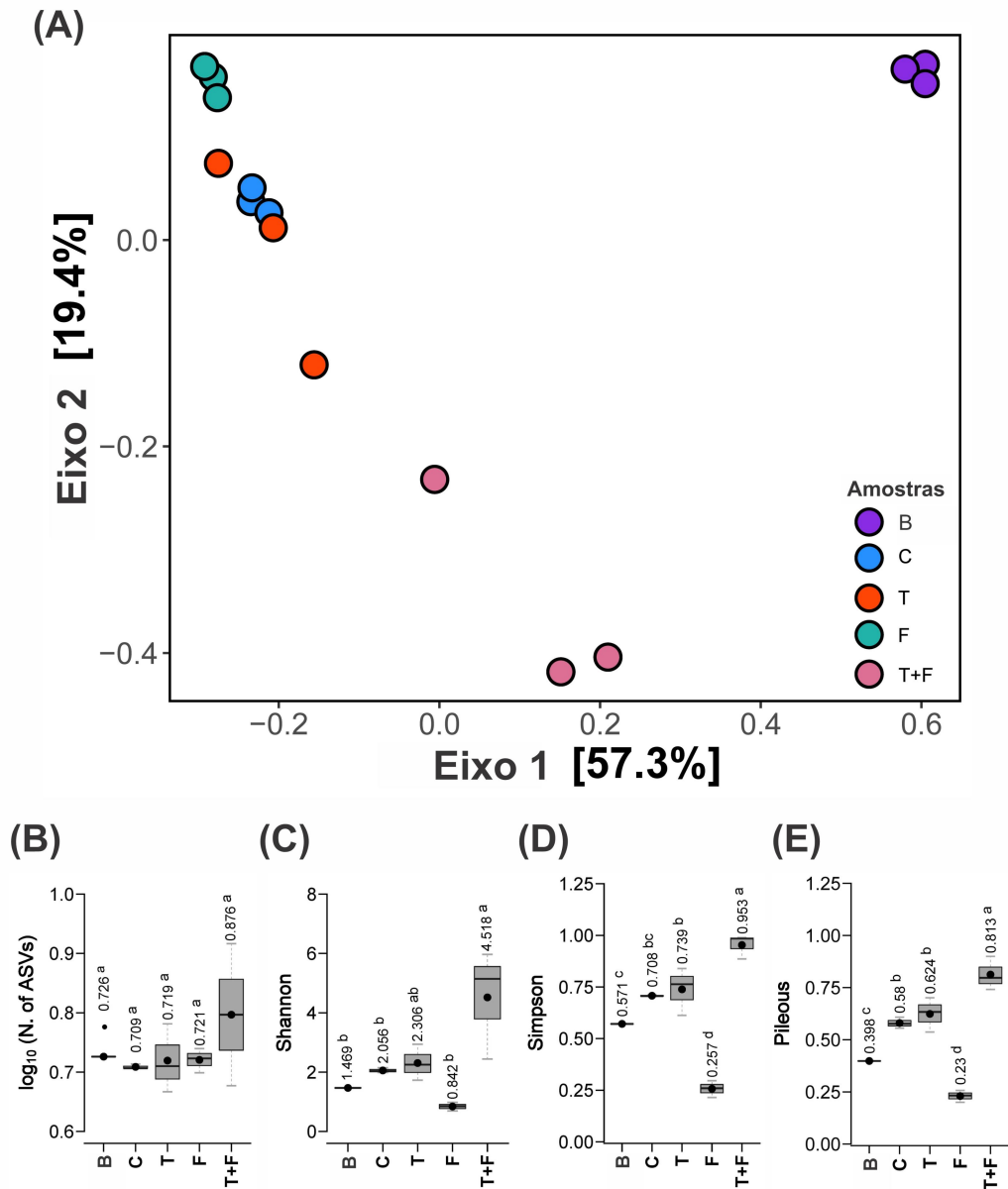


Figura 3: Estrutura e diversidade alfa de comunidades bacterianas em intestinos de *Rhipicephalus microplus* e sangue de bezerro. (A) Análise de diversidade beta da comunidade baseada em PCA, com base na matriz ponderada de distância UniFrac para ASVs, mostrando as diferenças entre os grupos; (B) Contagem de ASVs únicos; (C) índice de diversidade de Shannon; (D) índice de diversidade de Simpson; (E) Coeficiente de igualdade de Pileou. Os pontos indicam a localização exata dos meios. (B a E) Os tratamentos com médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas sobrescritas não diferem entre si pelo teste Tukey HSD ao nível de significância de 5%. Tratamentos: B – amostra de sangue puro do bezerro; ctrl – carrapatos não tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); T – carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina.

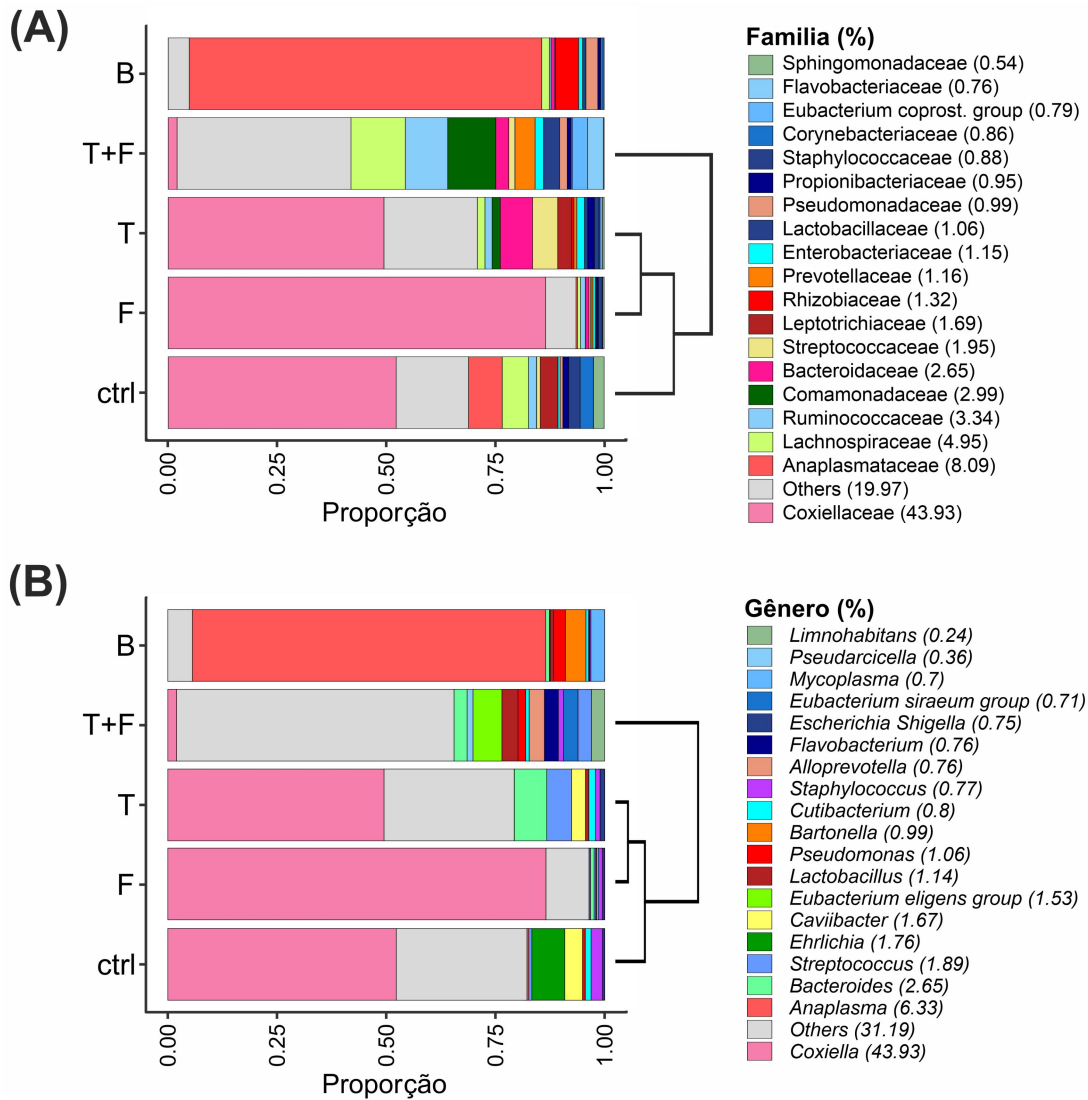


Figura 4: Composição de (A) famílias bacterianas e (B) gêneros predominantes nos intestinos dos carrapatos e no sangue puro do bezerro. As amostras foram agrupadas em dendrogramas de acordo com a distância calculada pelo coeficiente de correlação de Spearman. Tratamentos: B – amostra de sangue puro do bezerro; ctrl – carrapatos não tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); T – carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina

3.4 Ocupância de Nichos

De acordo com o método de classificação multinomial de espécies (CLAM), foram observados enriquecimentos até o nível da classe bacteriana (Figura 5). Em geral, as bactérias da classe gamaproteobactérias foram predominantes em todos os tratamentos. De acordo com o CLAM, os contrastes com o tratamento controle (ctrl) indicaram enriquecimento de Bacilos e Clostridia em F (Figura 5A), Clostridia e classes Actinobacteria em T+F (Figura 5B) e Alfaproteobactérias e Bacilos em B (Figura 5C). Enriquecimentos até o nível de gênero também foram observados, contrastando a ocupação de nicho de cada tratamento com o controle (Figura 6). Dependendo da comparação, os grupos enriquecidos (bactérias especialistas) no grupo controle variaram, com predomínio de *Faecalibacterium*, *Anaplasma* e *Streptococcus* (Figura 6).

Os intestinos do grupo T exibiram enriquecimento significativo de bactérias especializadas (51,4%), destacando-se ASVs associados a *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Anaplasma* e outras espécies Lachnospiraceae (Figura 6A). No intestino de fêmeas tratadas com fungos (F), as bactérias especialistas representaram 43% do total de ASVs, com destaque para *Cutibacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* e outros ASVs das famílias Lachnospiraceae e Rumnococcaceae (Figura 6B). Os intestinos de T+F exibiram espécies de bactérias especialistas limitadas a apenas 27,6%, destacando o enriquecimento dos gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Anaeorostipes*, *Phascolarctobacterium*, *Eggerthella* e outros associados às famílias Lachnospiraceae, Xanthobacteriaceae e Moraxellaceae (Figura 6C). Também foi feita a comparação entre as comunidades bacterianas do sangue de bezerro (B) e do intestino de carrapatos alimentados exclusivamente com sangue (ctrl), indicando predominância de especialistas nas taxas de 29,9% e 58,1%, respectivamente (Figura 6D). Neste caso, enriquecimentos significativos de ASVs associados aos gêneros *Cutibacterium*, *Faecalibacterium* e *Corynebacterium* foram observados no sangue em comparação com o controle.

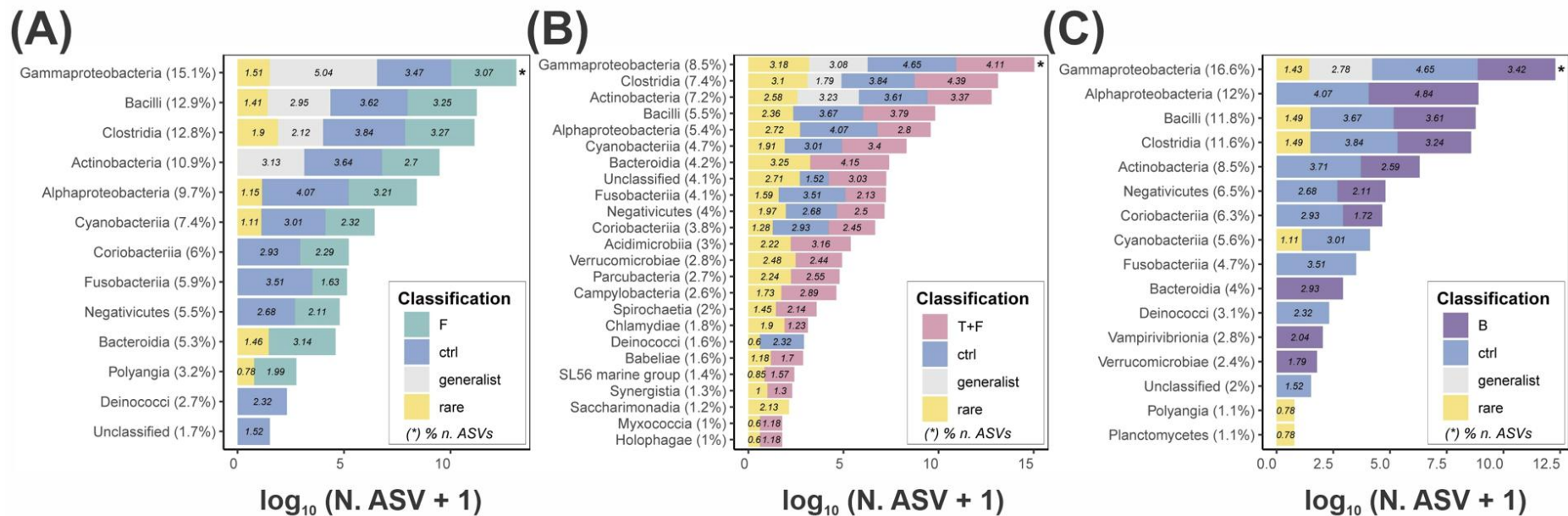


Figura 5: Participação relativa da classe bacteriana em cada nicho na rede de acordo com o Método de Classificação Multinomial de Espécies (CLAM). Os valores percentuais dentro das caixas foram calculados em uma escala ASV bruta para cada nicho. As comparações dos tratamentos T (A), T+F (B) e B (C) com o controle foram destacadas devido aos maiores contrastes. As porcentagens baseadas na transformação de log (ASV+1) estão no eixo vertical entre parênteses. Tratamentos: ctrl - carrapatos não tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; B - amostra de sangue puro do bezerro.

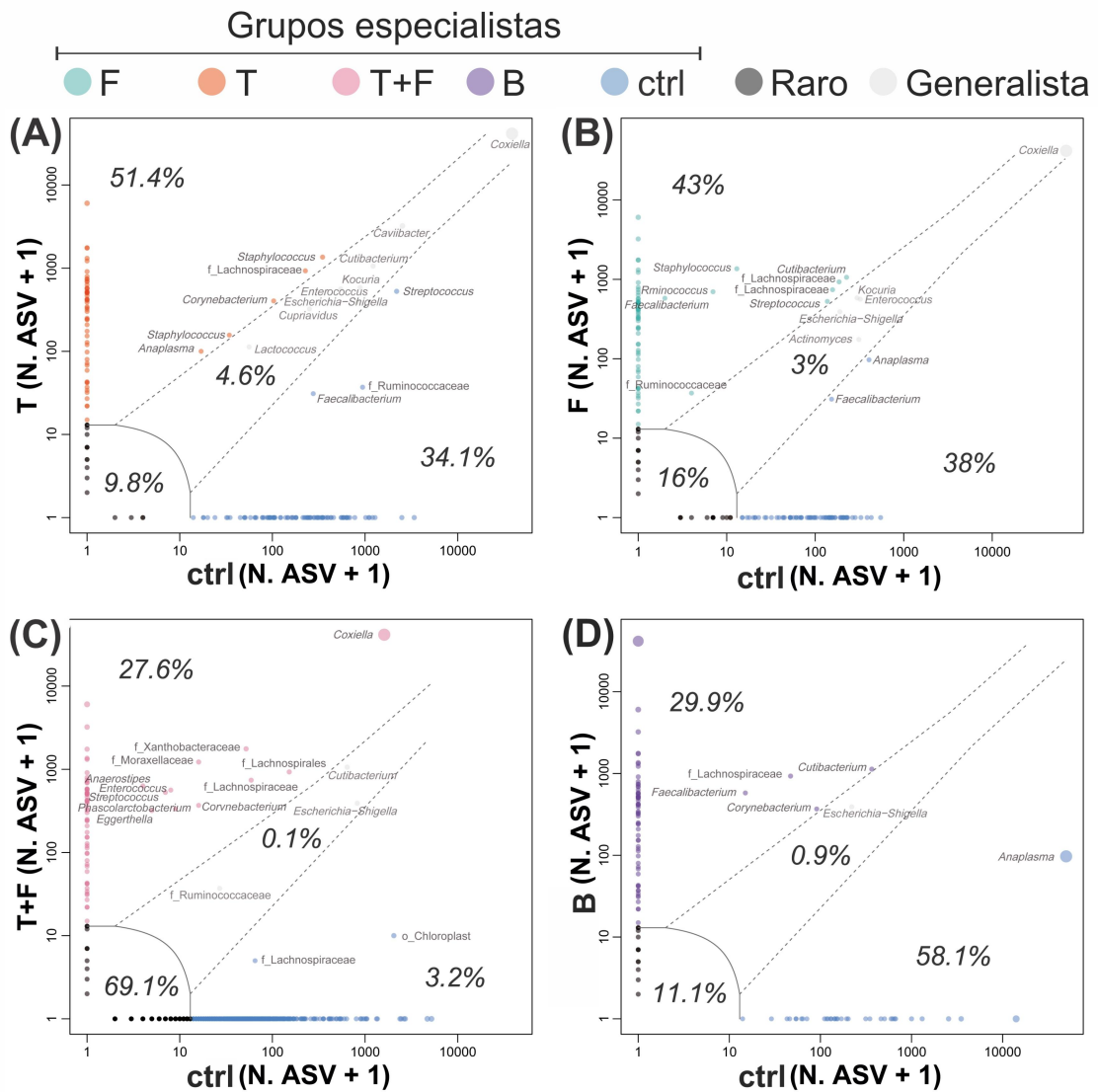


Figura 6: Método de classificação multinomial de espécies (CLAM) para o teste de ocupação de nicho. Os gêneros bacterianos foram mostrados apenas em círculos que se destacaram significativamente em cada habitat. Os generalistas (brancos), especialistas (laranja, azul, verde, rosa e roxo) e raros (cinza) são indicados com seus respectivos percentuais. Os valores percentuais representam a contagem direta de ASV único em cada nicho. (A) T versus ctrl; (B) F versus ctrl; (C) T+F versus ctrl; (D) sangue versus ctrl. Tratamentos: B – amostra de sangue puro do bezerro; ctrl – carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); T – carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina.

3.5 Análise de Rede de Co-ocorrência

A análise de co-ocorrência de ASVs destacou as espécies-chave (keystone) para manter as comunidades bacterianas nos diferentes tecidos estudados (Figura 7, Tabela 2). As comunidades bacterianas intestinais de carrapatos não tratados (CTRL) foram conectados principalmente por duas espécies de espécies-chave pertencentes aos gêneros *Ehrlichia* e *Coxiella*, seguidos por quatro ASVs associados aos gêneros *Cutibacterium*, *Faecalibacterium*, *Caviibacter* e *Bacteroides* (Figura 7A). Essa rede tinha 83 nós, 1.446 arestas e 68,19% das interações positivas (Tabela 2).

A comunidade bacteriana de T exibiu a mais alta complexidade da rede (nós = 106, bordas = 3.251, correlações positivas = 54,57%), com as espécies-chave associadas a um ASV de *Caviibacter*, seguido por *Coxiella* e, em menor grau, com *Cloacibacterium*, *Bacteroides*, e outras espécies de Lachnospiraceae e Peptostreptococcaceae (Figura 7B, Tabela 2).

Tabela 2: Métricas de rede das comunidades bacterianas no intestino de carrapatos e no sangue puro de bezerro.

Parâmetros	ctrl	T	F	T+F	B
Número de nós ^a	83	106	97	74	38
Número de vértices ^b	1446	3251	2185	1247	140
Vértices positivos ^c	68.19	54.57	67.19	44.03	48.57
Vértices negativos ^d	31.81	45.43	32.81	55.97	51.43
Componentes conectados ^e	1	1	1	1	1
Diâmetro da rede ^f	2	3	2	2	4
Densidade do gráfico ^g	0.425	0.584	0.469	0.462	0.199
Modularidade ^h	0.450	0.192	0.377	0.225	0.248
Média do grau ⁱ	34.843	61.34	45.052	33.703	7.368
Média do coeficiente de agrupamento ^j	0.875	0.866	0.875	0.590	0.340
Média do comprimento do percurso ^k	1.575	1.422	1.531	1.538	2.104
Grau máximo ^l	81	104	93	44	15

^a Número de ASVs únicas presentes na rede.

^b N. de correlações significantes entre as ASVs (peso ≥ 0.7 and p-value < 0.05).

^c Porcentagens de correlações positivas.

^d Porcentagens de correlações negativas.

^e N. de componentes separados na rede.

^f Menor distância entre os dois nós mais distantes na rede.

^g Medida de quantos nós entre ASVs existem em comparação com quantos empates entre ASVs são possíveis.

^h Medida da força da divisão de uma rede em agrupamento ou comunidades.

ⁱ Média do N. de vértices por nós.

^j Medida do grau ponderado em que os nós em um gráfico tendem a se agrupar.

^k N. médio de etapas ao longo dos caminhos mais curtos para todos os pares de nós possíveis.

^l Número máximo de conexões (vértices) observados.

Tratamentos: B – amostra de sangue puro do bezerro; ctrl – carrapatos não tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); T – carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina.

A rede de F mostrou a segunda mais alta complexidade (nós = 97, bordas = 2.185, correlações positivas = 67,19%), destacando como espécies-chave dois asvs do gênero *Coxiella*, seguido por *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Actinomyces* (Figura 7c, Tabela 2).

No intestino de carrapatos alimentados com tetraciclina e tratados com fungo (T+F), a complexidade da rede e o número de correlações positivas (nós = 74, bordas = 1,247, correlações positivas = 44,03%) foram inferiores às observadas nos tratamentos individuais (Ctrl, T ou F) (Figura 7D). Nesse caso, vários ASVs assumiram centralidades e graus de conexão semelhantes, destacando a participação de muitos gêneros, como *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Colidextribacter*, *Prevotella*, *Truepela*, *Campylobacter*, *Phascolarctobacterium* e outros, muitos desses grupos raros.

Como esperado, a comunidade bacteriana da rede do sangue do bezerro (B) era o menos complexo (nós = 38, bordas = 140, correlações positivas = 48,57%). Essa rede foi regulada por vários ASVs, principalmente os associados a *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia-Shigella*, *Bacteroides*, *Bartonella*, *Lactobacillus*, *Anaplasma* e *Mycoplasma* e um ASV associado à família Lachnospiraceae (Figura 7E).

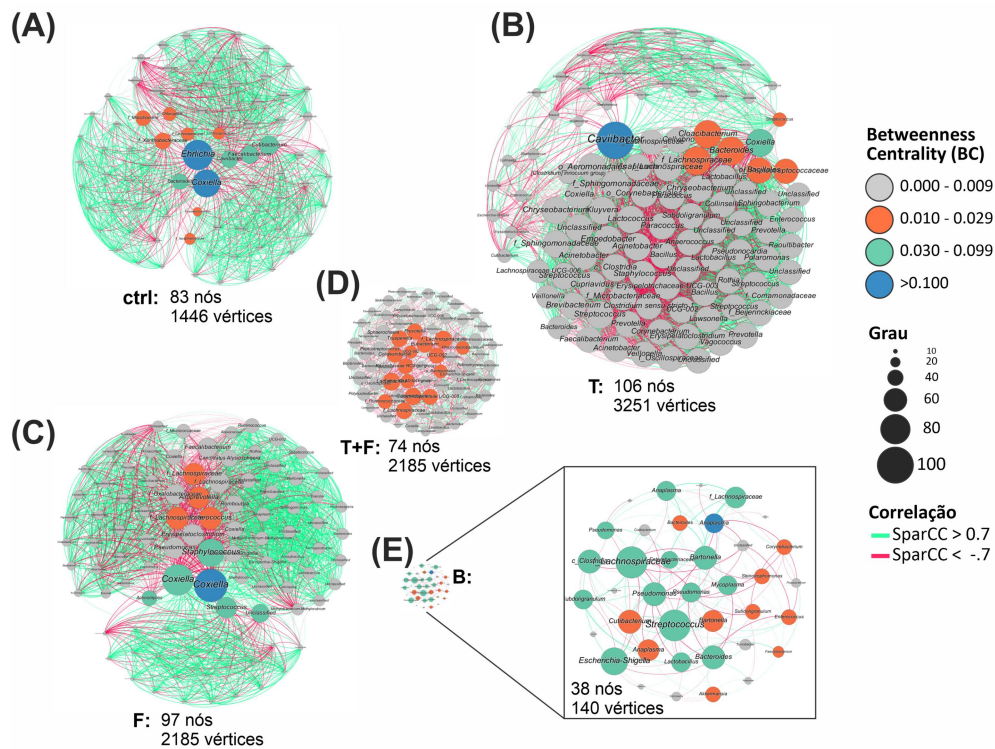


Figura 7: Análise de co-ocorrência de rede das comunidades bacterianas nos intestinos de *Rhipicephalus microplus* tratadas ou não com *Metarhizium anisopliae* com base no gene 16S rRNA. Ctrl - carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); Tratamentos: B – amostra de sangue puro do bezerro; ctrl – carrapatos não tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro (grupo controle); T – carrapatos não tratados com fungos previamente alimentados com sangue mais tetraciclina; F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue puro; T+F – carrapatos tratados com fungo previamente alimentados com sangue mais tetraciclina.

4. DISCUSSÃO

Os antibióticos desempenham um papel crucial no tratamento de doenças infecciosas, como mastite clínica (TOMAZI; DOS SANTOS, 2020) e doenças transmitidas por carrapatos (PFEFFER et al., 2018), podendo também ser utilizados como promotores de crescimento (BROWN et al., 2017). No entanto, o impacto da administração de antibióticos na suscetibilidade dos carrapatos ao tratamento com fungos ainda não foi elucidado. No presente estudo, os carrapatos foram alimentados artificialmente com tetraciclina (interferindo na microbiota intestinal) e tratados topicamente com um fungo entomopatogênico. Como esperado, a mortalidade de *R. microplus* foi significativamente maior nos grupos tratados com o fungo. Curiosamente, uma sobrevivência semelhante foi observada nas fêmeas tratadas com o fungo que foram previamente alimentadas ou não com o antibiótico. De acordo com o manual veterinário da Merck Sharp & Dohme Corp. (MSD), o tratamento com oxitetraciclina para bovinos é de $10 \text{ mg}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Aqui, a concentração de tetraciclina adicionada ao sangue bovino para a alimentação artificial do carrapato seguiu a proporção de $30 \text{ mg}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, baseada em estudo anterior (GUIZZO et al., 2017). Assim, mesmo quando submetidos a uma alimentação com sangue em uma maior concentração de antibióticos, a suscetibilidade dos carrapatos a *M. anisopliae* não foi afetada. Isso sugere que, quando os bovinos estão sob antibioticoterapia, a suscetibilidade das fêmeas do carrapato não seria afetada. Além disso, a tetraciclina não prejudicou a viabilidade fúngica quando comparada ao controle, no entanto, a morfologia da colônia exibiu algumas discrepâncias.

No presente estudo, o índice de diversidade bacteriana de Simpson e o coeficiente de igualdade de Pileou foram maiores no intestino de carrapatos alimentados com tetraciclina e tratados com o fungo (T+F) do que nos outros grupos (ctrl, T, F e B) 72h após o tratamento (Figura 2). Além disso, a análise de ocupação de nicho mostrou um maior número de espécies especialistas (ocorrem principalmente em um único grupo) do que generalistas (bactérias compartilhadas entre os grupos) para todos os grupos tratados em comparação com o controle, sugerindo que todos os tratamentos podem interferir na comunidade bacteriana intestinal do carrapato em diferentes níveis. A administração de antibióticos mais o tratamento fúngico também teve a maior proporção de sequências muito raras para serem classificadas (isto é, números insuficientes de sequências para serem analisados). De acordo com a participação relativa da classe bacteriana no Método de Classificação Multinomial de Espécies (CLAM) (Figura 5), foi demonstrado que os táxons bacterianos em F também foram encontrados em T+F, porém, as sequências dos cinco táxons mais abundantes foi maior em F do que em T+F. Além disso, houve um aumento no número de táxons em T+F, alterando assim a composição bacteriana quando comparada a F. Diferenças entre o grupo tratado com fungo com ou sem interferência do antibiótico na análise de co-ocorrência de rede (Figura 7) indicam como as interações entre bactérias e espécies-chave em cada grupo variaram. O grupo T+F exibiu o maior índice de diversidade (Figura 3) em contraste com o menor número de espécies-chave e interações bacterianas. As espécies-chave não são necessariamente abundantes, mas têm um forte impacto em outras espécies com base no número de interações (POWER et al., 1996; BERRY AND WIDDER, 2014). Além disso, essas espécies são capazes de moldar a composição da comunidade devido à sua forte conexão. Por outro lado, olhando para os dados T+F sugere-se que o maior número de espécies que aumentaram o índice de diversidade não estabelece interações sólidas, provavelmente porque são bactérias oportunistas que só surgiram devido à interferência do tratamento conjunto entre fungo e antibiótico.

Os microrganismos endossimbiontes têm um papel importante nos artrópodes hematófagos obrigatórios; fornecendo nutrientes, que são escassos em uma dieta de sangue (NARASIMHAN et al., 2021; GUIZZO et al., 2022;). *Ornithodoros moubata* é dependente da

bactéria endossimbionte *Fransicella*, responsável pela síntese de vitamina B (DURON et al., 2018). Guizzo et al. (2017) demonstraram que para *R. microplus*, *Coxiella* sp. é um endossimbionte crítico para a maturação da metaninfa e fisiologia do carrapato. Esses autores também mostraram que *Coxiella* sp. foi abundante em diferentes tecidos de fêmeas de *R. microplus*, com predominância no ovário e túbulos de Malpighi, mas níveis muito baixos no intestino. Por outro lado, em nosso estudo, *Coxiella* spp. foi a bactéria mais abundante nos intestinos de *R. microplus* em quase todos os grupos. O gênero *Coxiella* spp. foi mais abundante em F do que nos demais tratamentos, sugerindo que a infecção fúngica estimula o enriquecimento de *Coxiella* spp. no intestino do carrapato, diminuindo outros táxons e reduzindo a diversidade bacteriana. Esse resultado também foi observado com *A. stephensi*, após tratamento com *B. bassiana* (WEI et al., 2017). Esses autores relataram que o simbionte *Serratia marcescens* aumentou no intestino do mosquito após o tratamento com o fungo. Em contraste, aqui, os intestinos do grupo T+F exibiram o menor índice de abundância de *Coxiella* spp. e a maior diversidade. Neste grupo, a redução de *Coxiella* spp. é provavelmente resultado da combinação da administração de tetraciclina (agente de amplo espectro que inibe a síntese proteica bacteriana) (SCHNAPPINGER; HILLEN, 1996) mais o tratamento do fungo. Assim, a redução de *Coxiella* spp. provavelmente permitiu a incidência de outras bactérias no intestino, o que poderia explicar o aumento da diversidade.

Até onde sabemos, este é o primeiro relato de interações da microbiota intestinal de carrapatos com fungos entomopatogênicos. Estudos anteriores com diferentes espécies de insetos (WEI et al., 2017; XU et al., 2019; ZHANG et al., 2019) relataram que alterações na microbiota intestinal podem melhorar ou prejudicar a ação fúngica entomopatogênica dependendo do artrópode hospedeiro. Esse resultado pode ser devido a variações na composição da microbiota de diferentes hospedeiros. A alteração na microbiota do carrapato desencadeada pela tetraciclina não foi capaz de afetar a sobrevivência do carrapato ou influenciar na ação do fungo, conforme demonstrado na figura 2A. Os grupos que não foram tratados com fungos exibiram curvas de sobrevivência semelhantes independentemente da administração de antibióticos e o mesmo resultado foi mostrado entre os grupos tratados com fungos. Resultados análogos foram observados por Ramirez et al. (2018) com *Aedes aegypti*. Segundo esses autores, a redução da carga bacteriana intestinal não alterou a virulência do fungo entomopatogênico, mesmo utilizando uma alta concentração fúngica. É possível que essas bactérias eliminadas não tenham influenciado o sucesso ou o fracasso da infecção fúngica.

O presente estudo analisou os intestinos de carrapatos três dias após o tratamento com *M. anisopliae*. Esse tempo foi escolhido com base em trabalhos não publicados que demonstraram que, após 72h, os conídios LCM S04 já teriam germinado e penetrado na cutícula de *R. microplus*, atingindo os órgãos internos do carrapato. Assim, o que pode ter acontecido além das 72h em relação às interações bactéria-fungo ainda precisa ser elucidado. *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Cavibacter*, *Cutibacterium* e *Escherichia/Shigella* foram os gêneros mais comuns observados nos intestinos do grupo controle (ctrl). Uma comparação da comunidade bacteriana entre o grupo controle (ctrl) e a amostra de sangue do bezerro (B) demonstrou pouquíssimas semelhanças, sugerindo que o perfil bacteriano no intestino dos carrapatos não se originou inteiramente do sangue do bezerro. Ainda assim, a amostra de sangue e o grupo controle compartilharam apenas 0,9% das sequências, seguido por ctrl e T+F, com 0,1% de generalistas. Essas bactérias também podem ser herdadas através de gerações e, finalmente, através da pele do hospedeiro (NARASIMHAN et al., 2021). Essa perda de táxons entre o sangue do hospedeiro e o carrapato pode ocorrer durante o processo de digestão do sangue, uma vez que o intestino do carrapato possui estratégias de defesa contra microrganismos invasores. Essa defesa é impulsionada principalmente por fragmentos derivados de

antimicrobianos da hemoglobina chamados hemocidinas (KOPACEK et al., 2010). Além disso, as defesas no intestino são compostas por moléculas como peptídeos antimicrobianos e possivelmente espécies reativas de oxigênio (FOGACA et al., 2021b).

O gênero *Ehrlichia* foi encontrado nos intestinos de ctrl, mas não detectado em F, T, nem T+F. Em 2016, Cabezas-Cruz et al. (2016) descreveram uma nova espécie, *Ehrlichia minasensis* isolada da hemolinfa de *R. microplus*, patogênica para bovinos. Até o momento, *E. minasensis* e *E. ruminantium* são as únicas espécies do gênero *Ehrlichia* conhecidas por infectar bovinos naturalmente (ALLSOPP, 2010; CABEZAS-CRUZ et al., 2019). Embora a identificação em nível de espécie não tenha sido realizada no presente estudo, a não detecção de *Ehrlichia* no intestino de carrapatos tratados com o fungo reforça a hipótese de que a infecção pelo fungo entomopatogênico pode impactar negativamente na ocorrência de uma bactéria causadora de doença transmitida por carrapato. Estudos relataram o efeito de fungos entomopatogênicos na transmissão e no ciclo de vida de patógenos transmitidos por vetores após o tratamento do artrópode com o fungo, ex.: *Glossina fuscipes fuscipes* e *Trypanosoma congolense* (WAMITI et al., 2018); *Anopheles gambiae* e *Plasmodium falciparum* (FANG et al., 2011). No entanto, até onde sabemos, a literatura é ausente em relação às interações carrapato-patógeno-fungo, especialmente quando comparada a estudos com insetos. Aqui, a interferência na microbiota intestinal do carrapato pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium* indica um campo explorável desse fungo em seu uso contra carrapatos. Consequentemente, é necessária uma investigação mais aprofundada sobre as interações tripartidas entre carrapatos versus patógenos versus fungos.

5. CONCLUSÕES

Desafiar *R. microplus* com *M. anisopliae* altera a comunidade bacteriana intestinal do carrapato principalmente por aumentar o enriquecimento do endossimbionte *Coxiella*. A administração de tetraciclina mais o tratamento com *M. anisopliae* leva a uma redução dramática na população de *Coxiella* e altera a comunidade bacteriana intestinal de *R. microplus* aumentando sua diversidade bacteriana. No entanto, a antibioticoterapia não influencia a suscetibilidade do carrapato ao fungo entomopatogênico.

CAPÍTULO II

AÇÃO DE UM FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO CONTRA *Ixodes scapularis* NO CONTEXTO DA MICROBIOTA DO CARRAPATO E DE *Borrelia burgdorferi*

RESUMO

Os carrapatos e as doenças transmitidas por esses artrópodes são uma das principais preocupações na saúde pública, sendo responsáveis por enormes prejuízos econômicos. Desta forma, estudos sobre estratégias alternativas de controle estão avançando para diminuir o número de carrapatos e, portanto, o número de pessoas infectadas por patógenos. *Ixodes scapularis* são encontrados em áreas urbanas e residenciais gerando preocupação entre as autoridades, uma vez que são vetores de agentes patogênicos como *Borrelia burgdorferi*. A proposta de aplicar o controle biológico usando fungos entomopatogênicos tem demonstrado resultados promissores, porém, não há dados sobre como a ação dos entomopatógenos é afetada pelos patógenos transmitidos por carrapatos e vice-versa. Assim, os objetivos aqui propostos foram: avaliar a sobrevivência e o ingurgitamento de *I. scapularis* após a inoculação de *Metarhizium anisopliae* ARSEF 549, e a suscetibilidade apresentada entre carrapatos infectados ou não por *B. burgdorferi* a fungos entomopatogênicos; analisar a expressão relativa dos genes *16S*, *flaB* e *Myd88* para investigar mudanças na microbiota intestinal, colonização de *B. burgdorferi* e resposta imune de *I. scapularis* entre carrapatos infectados por *B. burgdorferi*, tratados ou não com *M. anisopliae*, respectivamente. Para os ensaios biológicos, *I. scapularis* infectado (Bb) ou não (clean) com *B. burgdorferi* foram testados em ensaios independentes. Nos primeiros ensaios, foi realizada inoculação de 40nL de suspensão de *M. anisopliae* ARSEF 549 em duas concentrações diferentes 1×10^6 e 1×10^8 conídios mL^{-1} (~40 e 4000 conídios, respectivamente) ou solução aquosa de tween para controle (Ctr). Posteriormente, carrapatos (clean) e (Bb) foram avaliados em um mesmo experimento utilizando apenas a menor concentração de suspensão ARSEF 549 (1×10^6 conídios mL^{-1}). A sobrevivência foi registrada diariamente por seis dias em cada repetição. O peso final das fêmeas após alimentação e a expressão relativa dos genes selecionados foram realizados utilizando ninfas não alimentadas, previamente inoculadas com suspensão ARSEF 549 em 1×10^6 conídios mL^{-1} ou tween. Ensaios independentes foram executados com ninfas infectadas e não infectadas com *B. burgdorferi*. Porém, no mesmo experimento, carrapatos infectados e não infectados apresentaram a mesma curva de sobrevivência ($\chi^2 = 0$; $P > 0,99$). O peso das fêmeas também foi semelhante entre carrapatos não infectados e Bb, tratados ou não com *M. anisopliae*. A resposta imune obtida através do resultado da expressão relativa de *Myd88* demonstrou uma regulação positiva em carrapatos Bb tratados com fungo quando comparados ao grupo não tratado com fungo ($p = 0,002$). Ainda, não houve alteração na microbiota de carrapatos e no número de *B. burgdorferi*, pois a expressão relativa de *16S* rDNA e do gene *flaB* foi semelhante. Assim, usando uma dose baixa de fungos entomopatogênicos, poucas alterações foram observadas em carrapatos infectados por *B. burgdorferi* após a exposição fúngica. Ainda assim, como resultados divergentes foram observados em relação à virulência fúngica entre carrapatos não infectados e Bb, este estudo representa o primeiro passo nas investigações entre entomopatógenos e patógenos transmitidos por carrapatos. Dessa forma, destaca-se aqui a importância desse campo de estudo para futuras estratégias de controle biológico.

Palavras-chave: doença de Lyme; zoonose; *Metarhizium anisopliae*

ABSTRACT

Ticks and tick-borne diseases are one of the main concerns in public health, being responsible for enormous economic damages. In this way, investigations of alternative control strategies are moving forward to decrease the number of tick and thus, the number of infected people. *Ixodes scapularis* ticks are found among urban and residential areas raising concerns among authorities since these ticks are vectors of pathogenic agents as *Borrelia burgdorferi*. The proposal to apply biological control using entomopathogenic fungi have demonstrated promising results, however, there is no data regarding how entomopathogens' action is affected by tick pathogens and vice-versa. Accordingly, the goals proposed here were: to evaluate *I. scapularis* survival and blood-feeding performance through after inoculation of *Metarhizium anisopliae* ARSEF 549 and whether *B. burgdorferi* infected ticks have different susceptibility to entomopathogenic fungi; to analyze the relative expression of *16S*, *flaB* and *Myd88* genes to investigate a shift in the gut microbiota, *B. burgdorferi* colonization and tick immune response between *B. burgdorferi* infected ticks treated or not with *M. anisopliae*, respectively. For the biological assays, *I. scapularis* infected (Bb ticks) or not (clean ticks) with *B. burgdorferi* were tested in independent trials. First round of assays was carried out inoculating 40nL of *M. anisopliae* ARSEF 549 suspension at two different concentrations 1×10^6 and 1×10^8 conidia mL^{-1} (~40 and 4000 conidia, respectively) or Tween aqueous solution for control (Ctr) using only clean ticks. Then, clean and Bb ticks were evaluated at the same time using only the lower concentration of ARSEF 549 suspension at 1×10^6 conidia mL^{-1} . Survival was daily recorded for six days in every replicate. Engorgement weight and relative expression of selected genes were performed using unfed nymphs previously inoculated with ARSEF 549 suspension at 1×10^6 conidia mL^{-1} or tween. Independent assays were executed with *B. burgdorferi* infected and uninfected nymphs. However, at the same experiment, clean and Bb ticks have shown the same survival curve ($\chi^2 = 0$; $P > 0.99$). Engorgement weight were also similar between clean and Bb ticks treated or not with *M. anisopliae*. Immune response through relative expression result of *Myd88* have demonstrated an upregulation in Bb ticks treated with fungus when compared to fungus untreated group ($p = 0.002$). Thus, there was no alteration in tick microbiota and *B. burgdorferi* number as relative expression of *16S* rDNA and *flaB* gene were similar. Accordingly, using a low dose of entomopathogenic fungi, few disruptions were observed in *B. burgdorferi* infected ticks after fungal exposure. Still, as divergent results were observed regarding fungal virulence between clean and Bb ticks, this study represent the first step of tick pathogen-entomopathogenic investigation. Therefore, it is highlighted here the importance of this field of study for future biological control strategies.

Keywords: Lyme disease; zoonosis; *Metarhizium anisopliae*

1. INTRODUÇÃO

Ixodes scapularis é o vetor da *Borrelia burgdorferi*, agente etiológico da doença de Lyme, bactéria responsável por aproximadamente 300.000 casos nos EUA (ROSENBERG et al., 2018). Além de *B. burgdorferi*, os carrapatos *I. scapularis* também podem transmitir outras espécies de *Borrelia*, *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. (KUROKAWA et al., 2020).

Em alguns casos, as doenças transmitidas por carrapatos têm tratamentos insatisfatórios e não podem ser completamente curadas. Assim, para reduzir as doenças transmitidas por carrapatos, é necessário reduzir a abundância de carrapatos. Agentes de controle biológico como fungos entomopatogênicos (EPF) são amplamente estudados como uma estratégia alternativa para o controle de carrapatos e demonstraram resultados viáveis em condições in vivo ou semi-campo com *Amblyomma variegatum* (NCHU et al., 2010), *Dermacentor nitens* (SOUZA et al., 2009), *R. annulatus* (SAMISH et al. 2014), *R. decoloratus* (KAAYA et al., 2011), *R. microplus* (CAMARGO et al., 2016; MESQUITA et al. 2020), *R. sanguineus* (ROT et al., 2013), *I. ricinus* (WASSERMANN et al., 2016) e *I. scapularis* (STAFFORD; ALLAN, 2014). Williams et al., (2018) mostraram uma diminuição nas ninfas não-alimentadas de *I. scapularis* em áreas tratadas com spray fúngico *Metarhizium brunneum* F52.

A interação entre fungos entomopatogênicos e seus hospedeiros artrópodes envolve a presença de microrganismos e os efeitos causados por eles. Recentemente, estudos vêm demonstrando a influência da microbiota hospedeira do inseto na ação dos fungos entomopatogênicos, uma vez que esses microrganismos estão presentes na cutícula, no trato digestivo e no interior das células (BOUCIAIS et al., 2018). Wei et al. (2017) mostraram que a microbiota intestinal do mosquito *Anopheles stephensi* contribui para a ação fúngica acelerando a morte do mosquito. Em contraste, Zhang et al. (2018) mostraram um impacto negativo na atividade fúngica inseticida quando a microbiota de *Blattella germanica* (L.) (barata alemã) estava intacta. Em alguns insetos, como as abelhas, a microbiota intestinal é capaz de estimular o sistema imunológico do hospedeiro (KWONG; MANCENIDO; MORAN, 2017) e, portanto, a suscetibilidade a um isolado de fungo entomopatogênico pode ser menor. No entanto, a literatura sobre a influência da microbiota de artrópodes na ação fúngica (e vice-versa) é baseada em interações inseto-microbiota versus fungo, sem informações para carrapatos. Os tópicos mais recentes sobre a microbiota do carrapato revelam a diversidade na composição bacteriana usando o gene 16S para carga bacteriana, identificação taxonômica e fisiologia do carrapato). Normalmente, assume-se que os carrapatos seguem as mesmas regras dos insetos em relação ao papel da microbiota dos artrópodes na ação fúngica. No entanto, esses sistemas podem ter processos contrastantes e assumir semelhanças pode apresentar consequências críticas no planejamento de programas de controle biológico. Assim, investigar o papel da microbiota de carrapatos na ação de fungos entomopatogênicos contra esses hospedeiros artrópodes contribuirá para avanços nas estratégias de controle biológico desses vetores.

Adicionalmente, avaliar possíveis implicações da ação de fungos entomopatogênicos para a transmissão de patógenos por carrapatos é igualmente importante. *Metarhizium anisopliae* afetou a reprodução do *Trypanosoma congolense* em *Glossina fuscipes fuscipes* e a capacidade vetorial dessas moscas de transmitir o parasita (WAMITI et al., 2018). De acordo com Blandford et al. (2005) *A. stephensi* tratado com *Beauveria bassiana* e infectado com *Plasmodium chabaudi* apresentou redução na transmissão do patógeno em comparação ao

grupo sem o tratamento fúngico. Os autores também afirmaram que a infecção fúngica interferiu na alimentação sanguínea de *A. stephensi*. Uma cepa transgênica de *M. anisopliae* foi capaz de reduzir a transmissão do agente da malária *Plasmodium falciparum* em *Anopheles gambiae* (FANG et al. 2011). Avaliar se a infecção fúngica pode prejudicar o metabolismo do carrapato, a fim de reduzir o período de alimentação, o número de patógenos e/ou diminuir o tempo de vida melhoraria significativamente as estratégias de controle biológico. Além disso, esse tipo de coinfeção (patógeno transmitido por carrapato - EPF) é pouco estudado quanto à resposta imune dos artrópodes. No estudo da linhagem celular de *I. ricinus*, a molécula intracelular fator de diferenciação mielóide 88 (gene *MyD88*) diminuiu na presença de flavivírus, vírus da encefalite transmitida por carrapatos, vírus louping ill e *Anaplasma phagocytophilum* (MAINSFIELD et al., 2017). Além disso, o nocaute de *MyD88* em camundongos aumentou a transmissão e aquisição de *B. burgdorferi* entre o mamífero hospedeiro e *I. scapularis* (BOCKENSTED et al., 2006). Portanto, o presente estudo visa compreender a influência de *I. scapularis* infectado com *B. burgdorferi* e tratado com *Metarhizium anisopliae* na microbiota do carrapato; avaliar se *M. anisopliae* pode impactar a colonização de *Borrelia* e a alimentação sanguínea de carrapatos infectados por *Borrelia*; e como a coinfeção com *B. burgdorferi* e *M. anisopliae* desencadeia uma resposta imune a carrapatos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Suspensão Fúngica de *Metarhizium anisopliae*

Para os ensaios no presente estudo, foi utilizado o isolado fúngico *Metarhizium anisopliae* ARSEF 549 (Coleção do Serviço de Pesquisa Agrícola de Culturas Fúngicas Entomopatogênicas). As culturas foram cultivadas em meio Potato Dextrose Agar (PDA) sob condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$; $\geq 80\%$ UR) por 14 dias. Os conídios foram suspensos em solução de água destilada estéril com monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80®) 0,01% (v/v) e a concentração foi ajustada para 1×10^6 e 1×10^8 conídios mL^{-1} . A viabilidade fúngica foi avaliada por plaqueamento de uma alíquota de 20 μL de 1×10^4 conídios mL^{-1} da mesma suspensão fúngica em batata dextrose ágar (PDA). A germinação dos conídios foi determinada 24h após de incubação à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ usando um microscópio óptico (400 \times). Um mínimo de 100 conídios foi avaliado e a porcentagem de germinação foi calculada. As suspensões fúngicas utilizadas nos experimentos tiveram uma viabilidade de pelo menos 95%.

2.2 Colônia de *Ixodes scapularis* e infecção experimental com *B. burgdorferi*

Os carrapatos adultos e ninfas de *Ixodes scapularis* foram obtidos da colônia mantida nos laboratórios Erol Fikrig e Sukanya Narasimhan “Section of Infectious Diseases, Yale School of Medicine, Yale University” ou de colônias mantidas no “Centers of Disease Control and Prevention (CDC)”, GA. Experimentos usando camundongos fêmeas C3H/HeN seguiram o “Yale University Institutional Animal Care and Use Committee (YUIACUC)” sob o número de protocolo aprovado é 2020-0793.

Um isolado clonal de baixo número de passagens de *B. burgdorferi* N40 que é infeccioso para camundongos (Thomas et al., 2001) foi usado para inocular camundongos C3H/HeN. Aproximadamente, 100 μL de 1×10^5 N40 espiroquetas/mL foram injetadas por via

subcutânea. Biópsias de punção de pele foram coletadas de cada camundongo duas semanas após a inoculação. O DNA foi isolado usando o kit DNeasy (QIAGEN, Valencia, CA) e testado por PCR quanto à presença de espiroquetas conforme descrito abaixo. Larvas de *I. scapularis* (3-4 semanas de idade) foram colocadas nas regiões da cabeça e pescoço de camundongos C3H infectados com *B. burgdorferi* e alimentadas com larvas mudadas para gerar ninfas infectadas com *B. burgdorferi*.

2.3 Inoculação de *Metarhizium anisopliae* e Sobrevivência de *I. scapularis*

A análise de sobrevivência de *Ixodes scapularis* foi realizada incluindo carrapatos limpos (*B. burgdorferi*- não infectados) que foram divididos em três grupos de 20 ninfas não alimentadas, tratadas com *M. anisopliae* por inoculação direta de uma suspensão de conídios (grupo Fungo- 1×10^6 ou 10^8 conídios mL^{-1}) ou uma solução de água destilada estéril com Monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80[®]) 0,01% (v/v) (Grupo controle-CTR). Para a inoculação, as ninfas não alimentadas foram injetadas no poro anal usando um microinjetor (Drummond[®]) com uma suspensão de 40 nL de 1×10^6 ou 1×10^8 conídios mL^{-1} ou solução aquosa de Tween 80. Os números totais correspondentes de conídios injetados foram 40 e 4000, respectivamente. Após o tratamento, as ninfas não alimentadas foram colocadas em um dessecador de vidro à temperatura ambiente e UR $\geq 85\%$ em um ciclo de 10h claro/14h escuro. A mortalidade dos carrapatos foi registrada a cada 24 horas durante seis dias com base em testes anteriores. De acordo com esses primeiros ensaios, a menor concentração (1×10^6 conídios mL^{-1}) foi selecionada para realizar um novo ensaio para a análise de sobrevivência de carrapatos infectados por *Borrelia*. Assim, ensaios subsequentes foram realizados com ninfas de carrapatos infectados e não infectados por *Borrelia* usando 1×10^6 conídios mL^{-1} seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. Os bioensaios foram repetidos duas vezes.

2.4 Experimento de Alimentação de *Ixodes scapularis*

Foram utilizadas ninfas não infectadas (livres de patógenos) e não alimentadas, microinjetadas com fungo ou tween. Um camundongo foi usado para cada grupo, anestesiado intraperitonealmente com 150 mg/Kg de cetamina por peso corporal e 10 mg/Kg de xilazina por peso corporal, e 20 ninfas foram colocadas na cabeça e pescoço usando pinça. Ninfas não alimentadas foram deixadas por uma hora para fixação no camundongo (a fixação geralmente leva cerca de meia hora a uma hora) (Figura 1A). Depois que os camundongos estavam acordados, foram colocados em uma gaiola com fundo de arame metálico e água colocada sob o arame metálico para conter quaisquer carrapatos que se desprendessem do camundongo (Figura 1B). A ração para camundongos foi fornecida *ad libitum*. As ninfas microinjetadas puderam de alimentar em camundongos C3H/HeN (*naïve*) por cinco dias no máximo (ninfas ingurgitadas se desprendem no quarto e quinto dias após a fixação do carrapato). As ninfas alimentadas foram coletadas da água na gaiola (Figura 1C), lavadas em água corrente, secas e pesadas individualmente.

2.5 Experimento de Transmissão

Para os experimentos de transmissão, foram utilizadas ninfas infectadas com *Borrelia* (Bb). Ninfas Bb não alimentadas foram microinjetadas (tratadas com fungo ou não) e colocadas para se alimentar conforme descrito acima. Após alimentação e pesagem os carrapatos foram dissecados no mesmo dia da coleta, com pinças e lâminas estéreis utilizando água livre de nucleases (Ambion[®]). Os intestinos (em pools de dois ou três) foram suspensos em Trizol[®], homogeneizados em Bullet Blender[™] (NEXT ADVANCE) usando esferas de

óxido de zircônio (0,5 mm) (NEXT ADVANCE) e o RNA isolado de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen, CA). O cDNA foi sintetizado usando o kit iScript RT-PCR (BIORAD, CA). O mesmo procedimento foi realizado usando carrapatos infectados com *B. burgdorferi* para experimentos de transmissão. Os ensaios foram repetidos duas vezes.

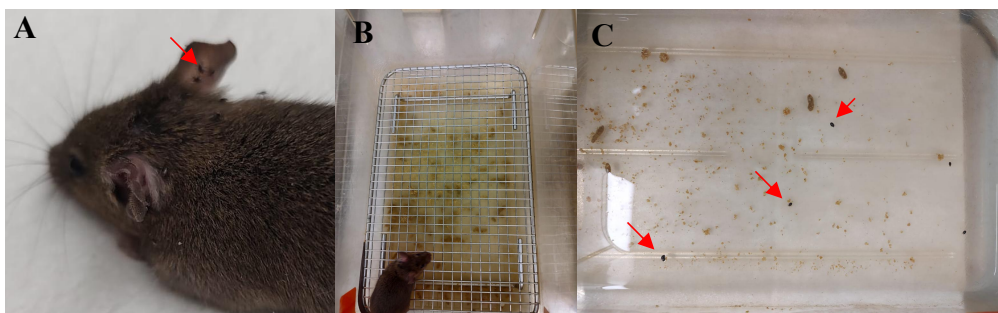


Figura 1: *Ixodes scapularis* alimentando-se em camundongos C3H e coleta de carrapatos em experimentos com *Metarhizium anisopliae*. (A) Ninfas não alimentadas em *I. scapularis* (setas vermelhas) para se fixarem no camundongo; (B) Gaiola equipada durante o experimento para coleta de carrapatos; (C) Ninfas de *I. scapularis* alimentadas após o ingurgitamento (setas vermelhas).

2.6 Expressão gênica e detecção de níveis de *Borrelia burgdorferi* no intestino do carrapato após tratamento com *Metarhizium*

A RT-qPCR foi realizada em uma reação usando um volume final de 10 μ L incluindo 5 μ L de SYBR Green Master Mix (Invitrogen, CA), 0,5 μ L de primer mix (10 μ M), 1 μ L de cDNA e 3,5 μ L de água livre de nucleases. Os níveis de expressão de FlaB, 16S rRNA Universal e Myd88 foram realizados usando primers descritos na Tabela 1 e normalizados para actina de carrapato (Tabela 1) por quantificação absoluta. A PCR foi executada usando primers flaB específicos de *B. burgdorferi* de acordo com Narasimhan et al. (2007; 2014). As amplificações por PCR foram realizadas em triplicado para cada amostra. O ciclo de PCR utilizado para esses primers foi realizado da seguinte forma: desnaturação a 95°C por 3'(1x) - desnaturação a 95°C por 10''; anelamento a 60°C por 20''; e 72°C por 20''; 76°C por 1''; 80°C por 1'' para extensão (35x) - 65°C por 5'' - 95°C'' – e então mantida a 25°. Os dados foram quantificados por extrapolação de um gráfico padrão gerado por diluições em série de 10 vezes de produtos de PCR específicos de genes purificados quantificados por NanoDropTM2000 (ThermoFisher Scientific) e dados normalizados para actina de carrapato usando quantificação absoluta. O resumo dos experimentos descritos acima está representado na figura 2.

Tabela 1: Primers dos genes alvo usados em reações de análise de amplificação quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR)

Gene	Sequência Forward	Sequência Reverse
<i>Tick actin</i>	ggcgacgtagcag	ggtatcgtgctcgactc
<i>flaB</i>	ttcaatcaggtaacggcaca	gacgcrrgagaccctgaaag
<i>16SUniversal</i>	gtgccagcagccgcggtaa	ccgtcaatcMtttRagttt
<i>Myd88</i>	atctcgtccatcaagagca	ggccttgcccttctggag

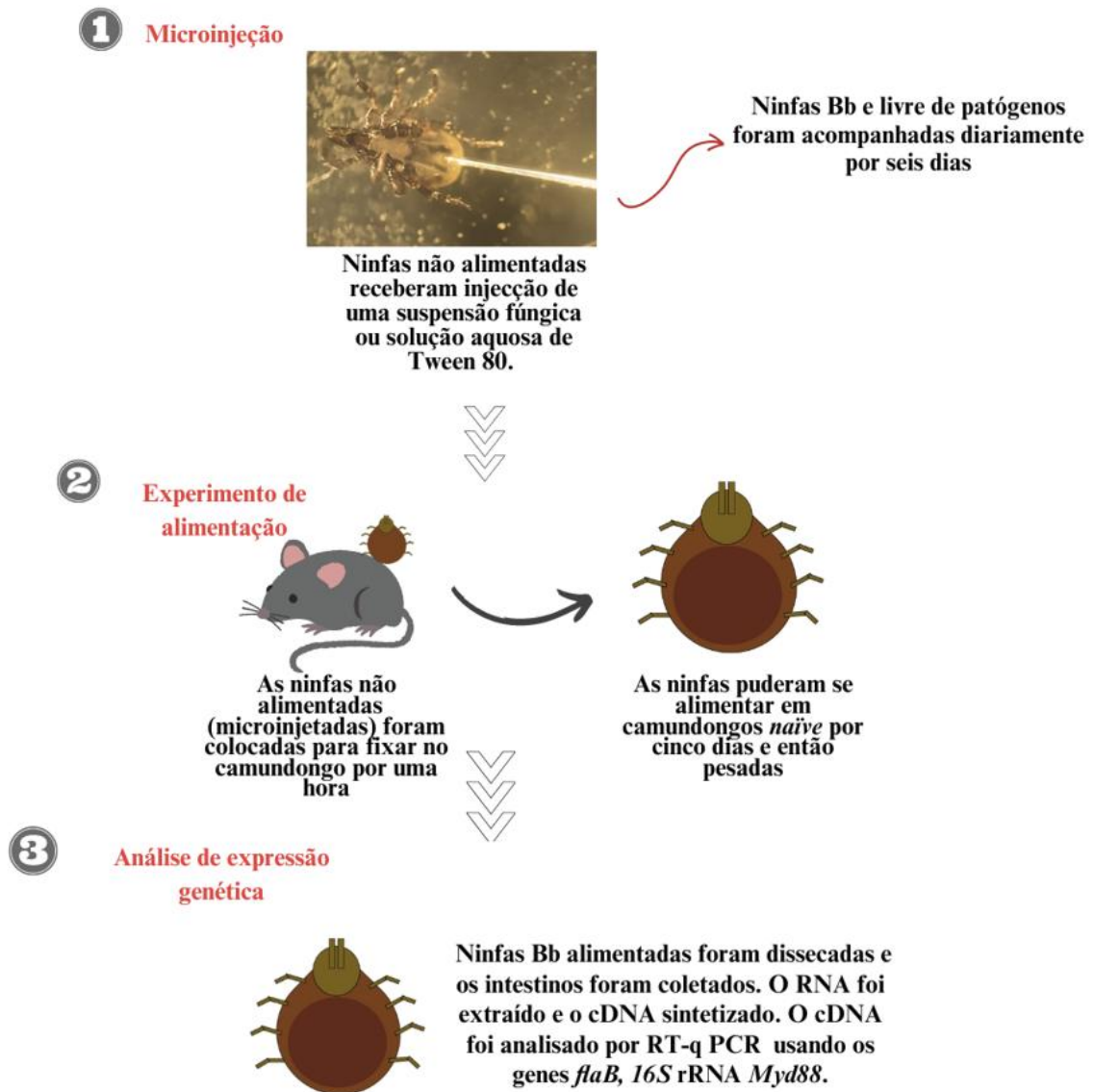


Figura 2: Diagrama de procedimentos experimentais de *Ixodes scapularis*. 1-Microinjeção de ninfas não alimentadas com suspensão de *M. anisopliae* ou solução aquosa tween para análise de sobrevivência, alimentação e expressão gênica (Bb e ninfas limpas); 2- Experimento de alimentação para avaliar o peso de ingurgitamento de ninfas microinjetadas (Bb e ninfas limpas); 3-Análise de expressão gênica de ninfas microinjetadas infectadas com *B. burgdorferi* após a alimentação (ninfas Bb).

2.7 Análises Estatísticas

As curvas de sobrevivência dos carrapatos foram analisadas pelo teste de Log-rank com nível de significância de 0,05 pelo GraphPad Prism versão 8.4.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). Os dados relacionados as outras análises foram verificadas quanto à normalidade usando um teste de Shapiro-Wilk com nível de significância de 0,05 pelo GraphPad Prism versão 8.4.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). O peso das ninfas ingurgitadas e a expressão gênica relativa dos dados de *Myd88* tiveram distribuições não normais e foram analisados com o teste de Mann-Whitney. Os dados dos genes *16S rRNA* e *FlaB* foram transformados por raiz quadrada antes da análise para atender melhor aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância e foram analisados pelo teste t.

3. RESULTADOS

3.1 Efeitos da Infecção com Fungo Entomopatogênico na Sobrevivência e Ingurgitamento de *Ixodes scapularis*

Os primeiros experimentos com carrapatos livres de patógenos (clean) de *I. scapularis* tratados com a maior concentração de *M. anisopliae* (1×10^8 conídios mL^{-1}) mostraram uma sobrevivência menor que o controle (Ctr) ($\chi^2 = 96,5$; $P < 0,0001$) e, carrapatos tratados com a menor concentração (1×10^6 conídios mL^{-1}) ($\chi^2 = 28,7$; $P < 0,0001$) (Figura 2A). A suspensão fúngica a 1×10^6 conídios mL^{-1} também reduziu a curva de sobrevivência do carrapato quando comparada ao controle ($\chi^2 = 20,4$; $P < 0,0001$). Análises posteriores com carrapatos infectados por *Borrelia* usando 1×10^6 conídios mL^{-1} demonstraram uma curva semelhante ao controle ($\chi^2 = 2,1$; $P = 0,14$) (Figura 2B).

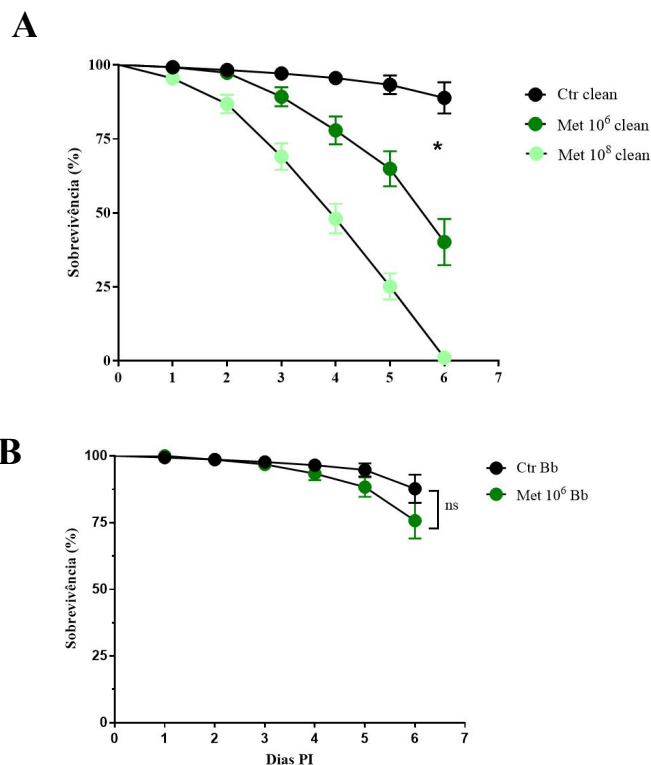


Figura 3: Porcentagem de sobrevivência e erro padrão de ninfas de *Ixodes scapularis* tratadas ou não com *Metarhizium anisopliae*. **(A)** Carrapatos limpos (não infectados com *Borrelia burgdorferi*) e **(B)** carrapatos Bb (infectados por *B. burgdorferi*). Ctr clean- Ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01% (grupo controle limpo); Met 10⁸ clean -Ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10^8 conídios mL^{-1} ; Met 10⁶ clean - Ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10^6 conídios mL^{-1} ; Ctr Bb- Ninfas de *I. scapularis* infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01% (grupo controle de *B. burgdorferi*); Met 10⁶ Bb - Ninfas infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10^6 conídios mL^{-1} . O asterisco indica uma diferença estatística entre ctrl clean e Met 10⁶ clean ($P < 0,05$) pelo teste de Log-Hank

As curvas de sobrevivência entre carrapatos limpos e infectados por *Borrelia* (carrapatos Bb) em ensaios seguintes são demonstradas na Figura 3. Grupos controle e tratados com *Metarhizium* com carrapatos limpos (não infectados com *Borrelia*) apresentaram curvas semelhantes ($\chi^2 = 2,4$; $P = 0,11$). O mesmo foi encontrado entre carrapatos limpos tratados com *Metarhizium* e infectados Bb tratados com *Metarhizium* com curvas bastante idênticas ($\chi^2 = 0$; $P > 0,99$). Os carrapatos infectados com *Borrelia* tratados com *Metarhizium* mostraram uma curva de sobrevivência mais baixa do que os carrapatos Bb de controle ($\chi^2 = 14,5$; $P = 0,0001$).

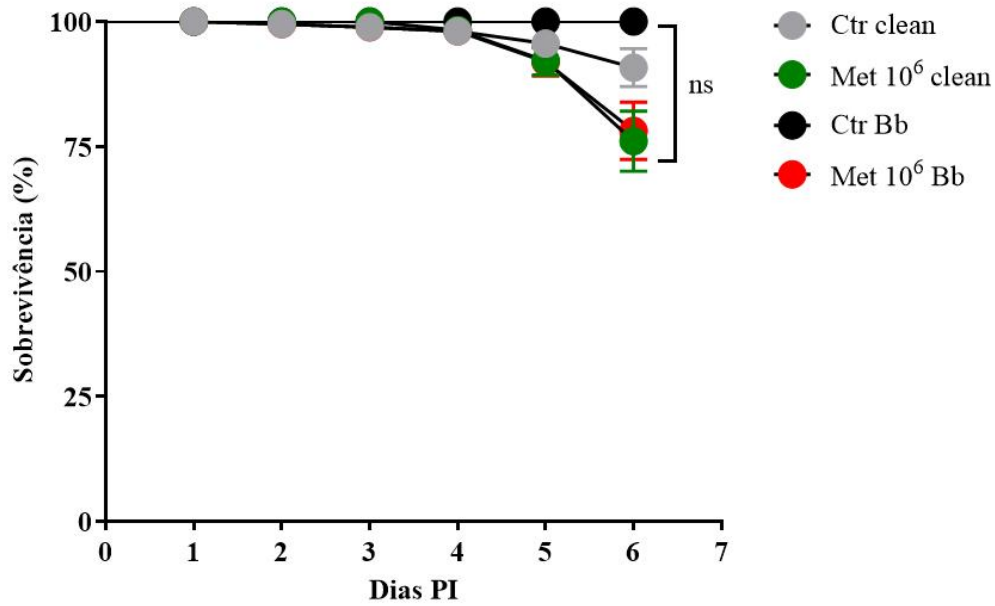


Figura 4: Porcentagem de sobrevivência e erro padrão de ninfas de *Ixodes scapularis* infectadas ou não, com *Borrelia burgdorferi* e tratadas ou não com *Metarhizium anisopliae*. Ctr clean- ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01%; Met clean- ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10^6 conídios mL^{-1} ; Ctr Bb- Ninfas infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01; Met Bb- Ninfas infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10^6 conídios mL^{-1} .

Os pesos de ingurgitamento das ninfas de ambos os grupos controle e fungo foram semelhantes após alimentação em camundongos infectados e não infectados por *Borrelia* (Figura 4).

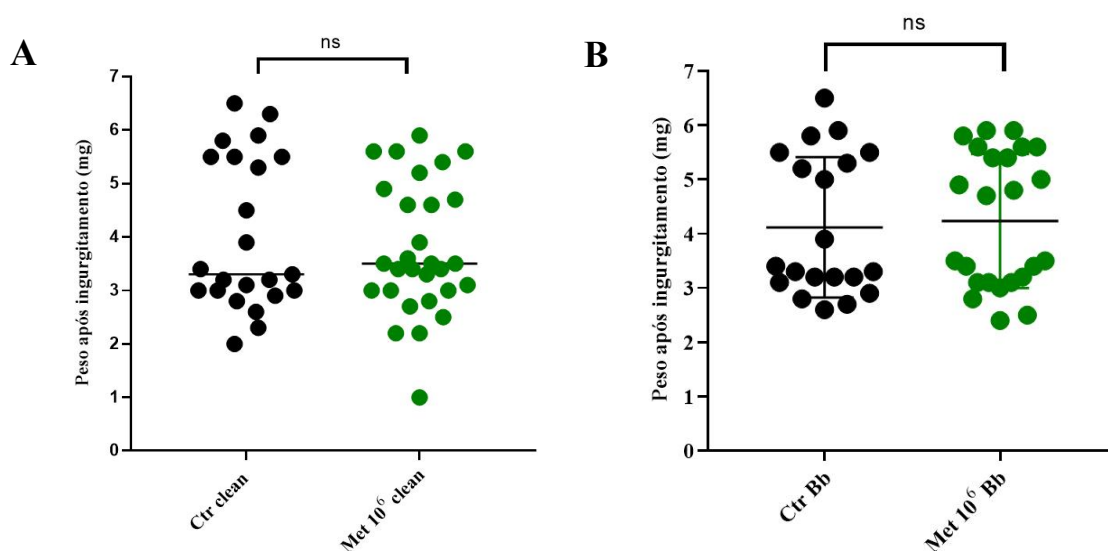


Figura 5: Peso do ingurgitamento após alimentação de ninfas de *Ixodes scapularis* infectadas ou não com *Borrelia burgdorferi* e tratadas ou não com *Metarhizium anisopliae*. Ctr clean- ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01%; Met 10⁶ clean- Ninfas de *I. scapularis* não infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10⁶ conídios mL⁻¹; Ctr Bb- Ninfas de *I. scapularis* infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01%. Cada ponto de dados representa um carrapato; Met 10⁶ Bb - Ninfas de *I. scapularis* infectadas com *B. burgdorferi* e inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10⁶ conídios mL⁻¹.

3.2 Expressão Relativa dos Genes *16S*, *flaB* and *Myd88* em *Ixodes scapularis* Infectados com *B. burgdorferi* Após Tratamento com *M. anisopliae*

A análise qRT-PCR dos níveis de transcrição de *16S* mostrou níveis de expressão estatisticamente semelhantes em ninfas do grupo controle (média \pm SE: $6,10 \pm 2,78$) quando comparado ao tratado com fungo ($15,76 \pm 4,03$) ($p=0,058$) (Figura 5A). O mesmo resultado foi encontrado para o gene *flaB* entre controle $0,05 \pm 0,02$ e fungo $0,13 \pm 0,05$, ambos com leve aumento após o tratamento com *Metarhizium*, porém não significativo ($p=0,21$) (Figura 5B). Conforme demonstrado na Figura 5C, a expressão relativa do gene *Myd88* foi maior no grupo do fungo ($4,09 \pm 0,56$) do que no controle ($1,28 \pm 0,38$) ($p=0,002$).

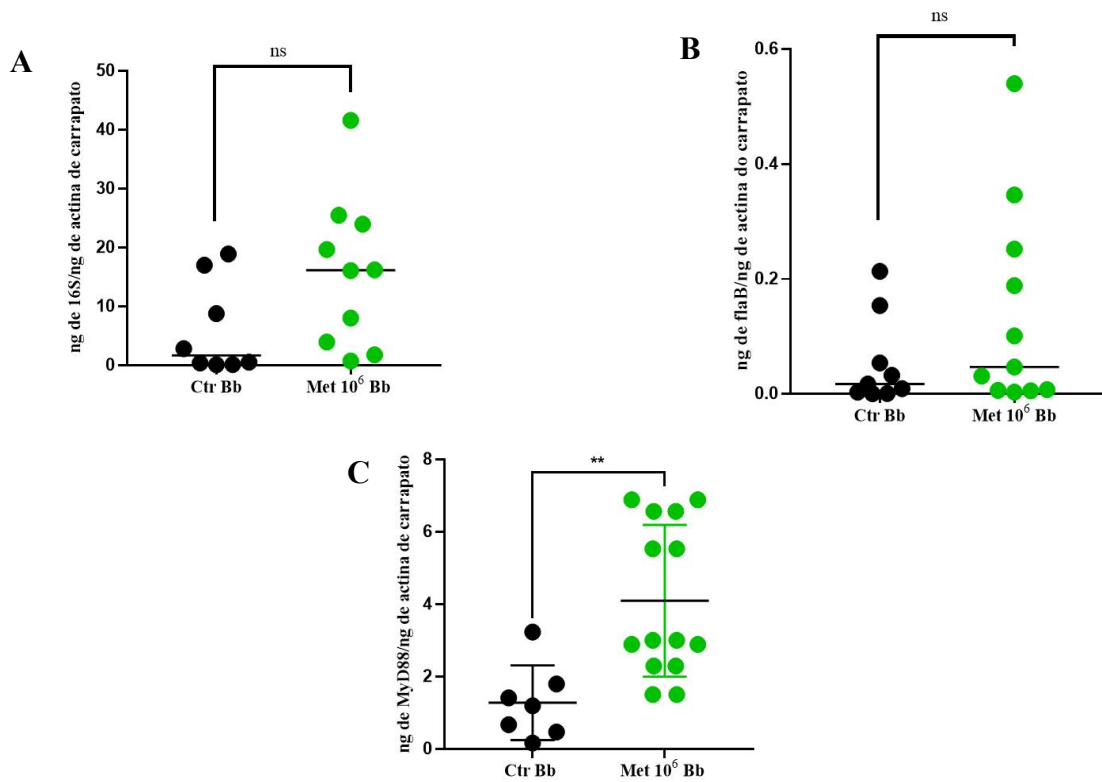


Figura 6: Expressão relativa dos genes *16S rRNA* (A), *flaB* (B) e *MyD88* (C) após inoculação de *Metarhizium anisopliae* em ninfas de *Ixodes scapularis* infectados com *Borrelia burgdorferi* após alimentação sanguínea e queda. Ctr Bb- Ninfas infectadas com *B. burgdorferi* inoculadas com solução de Tween a 0,01%; Met 10⁶ Bb - ninfas de *I. scapularis* infectadas com *B. burgdorferi* e inoculadas com suspensão de *M. anisopliae* a 1×10^6 conídios mL⁻¹; Cada ponto de dados representa um pool de intestino de 2-3 carrapatos. Os asteriscos indicam uma diferença estatística entre ctrl Bb e Met 10⁶ Bb ($P < 0,05$) pelo teste de Mann-Whitney.

4. DISCUSSÃO

Programas de controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos dependem de vários fatores para serem efetivos, uma vez que as características fúngicas e a suscetibilidade dos hospedeiros artrópodes não são as mesmas entre as espécies. Em condições naturais, há grandes chances de encontrar hospedeiros artrópodes infectados com patógenos no momento da aplicação do fungo. No entanto, a relação entre fungos entomopatogênicos, artrópode hospedeiro e patógeno é pouco explorada, uma vez que a literatura sobre o assunto é limitada, e torna-se especialmente difícil quando o artrópode hospedeiro é o carrapato. Neste capítulo, a virulência de *M. anisopliae* ARSEF 549 contra *I. scapularis* foi testada usando carrapatos infectados e não infectados por *Borrelia* (carrapatos limpos). Esse isolado demonstrou um resultado positivo no controle uma vez que a infecção resultou na morte de metade das ninfas não infectadas de *I. scapularis* em quatro dias usando 1×10^8 conídios mL⁻¹ (~ 4000 conídios), enquanto a concentração de 1×10^6 conídios mL⁻¹ (~ 40 conídios) atingiram essa margem após cinco dias (Figura 2A). Um estudo com o carrapato *Dermacentor variabilis* demonstrou que a associação com o fungo *Scopulariopsis brevicaulis* permite que esse carrapato sobreviva a dosagens de conídios de *M. anisopliae* que são geralmente letais para outras espécies de carrapatos quando aplicados topicamente (Yoder et al., 2008). Os autores afirmam que *D. variabilis/S. brevicaulis* é uma relação simbiótica mutuamente vantajosa.

Após este primeiro ensaio, para analisar melhor o desenvolvimento fúngico, a menor concentração (ou seja, 1×10^6 conídios mL⁻¹) foi selecionada para estudos posteriores. No presente estudo, quando avaliados juntos no mesmo ensaio, tanto os carrapatos infectados quanto os não infectados por *Borrelia* apresentaram curvas de sobrevivência muito semelhantes (Figura 3). Nesse contexto, já foi relatado que a coinfeção entre fungos entomopatogênicos e *T. cruzi* em triatomíneos *Rhodnius prolixus* (GARCIA et al., 2016) e *M. pallidipennis* (FLORES-VILLEGAS et al., 2019) resultou em maior sobrevivência do inseto, quando insetos tratados com fungos foram comparados aos não infectados. Isso, porém, não foi observado por Blanford et al. (2005) em *A. stephensi*, onde os autores mostram que o tempo médio de sobrevivência entre o tratamento com fungo sozinho e o fungo + *Plasmodium* foi o mesmo. Neste cenário, sugere-se que os programas de controle biológico usando fungos entomopatogênicos não seriam impactados negativamente se os carrapatos fossem naturalmente infectados com *B. burgdorferi*.

Um dos objetivos deste estudo foi avaliar se haveria diferenças entre carrapatos infectados por *B. burgdorferi* tratados ou não com *M. anisopliae*. Nos ensaios biológicos de *I. scapularis*, a alimentação sanguínea das ninfas não foi afetada pelo tratamento fúngico, e não houve diferença no peso pós alimentação dos carrapatos, infectado com *B. burgdorferi* ou não e tratado com *M. anisopliae* ou não (Figura 4A e 4B). Além disso, ninfas mortas (caídas antes do ingurgitamento total) não foram encontradas durante o experimento de alimentação. Paralelamente à análise de sobrevivência das ninfas, é importante esclarecer que, embora ambos os ensaios tenham sido realizados com a mesma concentração de *M. anisopliae* (1×10^6 conídios mL⁻¹) e método de inoculação, a análise de sobrevivência foi realizada com ninfas, enquanto no experimento de alimentação/transmissão, as ninfas foram se alimentaram após o tratamento com o fungo. A alimentação sanguínea desencadeia alterações metabólicas no corpo do carrapato e é sugerido que possa fortalecer o sistema imunológico de *I. scapularis* e, conseqüentemente, melhorar sua resposta ao fungo entomopatogênico. De fato, a alimentação sanguínea regula positivamente substâncias como proteínas redutoras do estresse oxidativo, lectinas, inibidores de proteases, proteases, hidrolases, agentes ligantes de proteínas/lipídios (SONENSHINE E HYNES, 2008). Além disso, a decisão de usar a menor dose pode ter sido

um obstáculo para o desenvolvimento do fungo, pois essa concentração permite a inoculação de no máximo 40 conídios. Ainda, alguns dos conídios podem ficar aderidos na agulha do microinjetor durante o processo, reduzindo assim o número de propágulos fúngicos e consequentemente a eficiência do tratamento fúngico.

Aqui, não foi possível observar uma diferença na expressão relativa de 16S entre os intestinos de carrapatos infectados por *Borrelia* com ou sem tratamento com *M. anisopliae* usando 1×10^6 conídios mL⁻¹. Embora os níveis de amplicon 16S não tenham mostrado diferença, uma análise detalhada do microbioma pode ser necessária para determinar se gêneros específicos são alterados ou se uma dose maior de fungo seria necessária para perturbar a microbiota. Além disso, o estudo focou apenas no intestino do carrapato, portanto existe a possibilidade de a resposta da microbiota ser diferente em outros tecidos e na hemolinfa no momento da análise.

Estudos prévios de fungos entomopatogênicos e *Ixodes* spp. também relataram eficiência para seu controle, mas pesquisas associadas ao período durante a alimentação sanguínea das ninfas são limitadas. Ninfas não alimentadas são geralmente a fase de escolha para estudos de virulência, mas quais interferências podem ocorrer nos próximos dias de tratamento ainda não são bem estudados. Este conhecimento, no entanto, pode ser crucial para projetar futuros programas de controle biológico, uma vez que o hábito alimentar das ninfas é o principal problema relacionado à doença de Lyme. Wassermann et al. (2016) descreveram uma taxa de sobrevivência de 8,5% e 18,5% para ninfas e larvas ingurgitadas de *I. ricinus*, respectivamente. Apesar dos autores não seguirem os mesmos objetivos aqui expostos, uma vez que seu estudo utilizou ninfas alimentadas, é importante mostrar diferentes estágios de exposição ao tratamento fúngico.

A imunidade do carrapato é o principal componente para moldar como esses artrópodes lidam tanto com infecções por patógenos como por fungos entomopatogênicos. O papel da via toll ainda não está claro em carrapatos infectados por *B. burgdorferi*, no entanto, o estudo sobre o genoma de *I. scapularis* relatou a expressão de receptores Toll-like (TLR) incluídos na cascata de sinalização Toll (GULI-NUSS et al., 2016). A resposta de imunidade à infecção por *Borrelia* e *Metarhizium* aqui foi testada usando a expressão da molécula adaptadora Myd88 envolvida em TLR, e o aumento desse gene no grupo de fungos com carrapatos infectados por *Borrelia* pode sugerir que a reação de *I. scapularis* a fungos entomopatogênicos também pode ocorrer por via Toll. Ainda assim, ambas as infecções podem aumentar a sinalização da via Toll neste carrapato, como uma resposta inespecífica. Em *Drosophila* esta via é conhecida por ser ativa na presença de fungos (FOGAÇA et al., 2021). Além disso, os genes marcadores da via Toll foram regulados positivamente em *A. aegypti* após a infecção por *B. bassiana* (DONGO et al., 2012). Até o momento, a resposta de carrapatos contra os entomopatógenos foi relatado por meio da defesa imune celular (FIOROTTI et al., 2021; KOPÁČEK et al., 2010). A fagocitose tem um papel importante como parte da imunidade inata do carrapato contra patógenos, onde os plasmatócitos e alguns granulócitos são as células principalmente fagocitárias (FOGAÇA et al., 2021; KOPÁČEK et al., 2010). Fiorotti et al. (2021) investigaram o papel do complemento em *I. ricinus* e revelaram a importância das proteínas contendo tioéster (TEPs) para a fagocitose. Além disso, peptídeos antimicrobianos (AMPs) também estão envolvidos na resposta de carrapatos a fungos (FOGAÇA et al., 2021), mas ainda não se sabe se AMPs também estariam envolvidos em coinfeções.

A relação entre *I. scapularis* e *B. burgdorferi* é bem estabelecida e bem-sucedida, portanto, carrapatos infectados por *Borrelia* podem ser genuinamente menos suscetíveis à infecção fúngica entomopatogênica. Para compreender os resultados acima, a carga de *Borrelia* foi verificada entre os grupos com ou sem tratamento com *M. anisopliae*, e embora

tenha sido possível notar uma tendência de aumento no grupo de fungos (figura 4B), houve um resultado semelhante entre os carrapatos infectados por *Borrelia* tratados ou não com *M. anisopliae*. Este resultado não corrobora com relatos anteriores usando modelos de insetos (BLANDFORD et al., 2005; FANG et al., 2011; WAMITI et al., 2018). A resposta relativa de *Fold change* de *T. congolense* em *G. f. fuscipes* após o tratamento com o fungo foi menor quando comparado ao controle (WAMITI et al., 2018). No entanto, a baixa dose de fungo usada no presente estudo pode ter sido apenas o suficiente para sinalizar a proliferação de *Borrelia*, pois haviam dois microrganismos diferentes competindo pelo mesmo hospedeiro, mas não suficiente para diminuir a carga de *Borrelia*. Esta situação também é relatada entre a co-infecção com *B. burgdorferi* e *Babesia microti*, onde esta última não é capaz de realizar uma colonização satisfatória, falhando em completar a transmissão em um carrapato infectado por *Borrelia* bem estabelecido (MATHER et al., 1990). *B. burgdorferi* é conhecido por modular o ambiente intestinal de carrapatos por meio de secreções de inúmeras substâncias, usando estratégias para reduzir o custo de aptidão para carrapatos (KUROKAWA et al., 2020).

5. CONCLUSÕES

A co-infecção por *M. anisopliae* e *B. burgdorferi* aumentou a resposta imune de *I. scapularis*, portanto, sugere-se que o gene Myd88 esteja envolvido na ação de *I. scapularis* contra fungos entomopatogênicos. O tratamento com *M. anisopliae* não alterou a carga bacteriana em *I. scapularis* infectado com *B. burgdorferi*. Além disso, *M. anisopliae* não alterou a colonização de *B. burgdorferi* após a inoculação do fungo. O desempenho hematófago de carrapatos, infectados ou não por *B. burgdorferi*, não foi afetado pelo tratamento com o fungo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aqui foi possível demonstrar que aplicação tópica do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* altera a composição bacteriana intestinal de *R. microplus*, observando o enriquecimento de uma bactéria endossimbionte. Próximos estudos podem ser empregados para entender o papel desse endossimbionte quando na presença de fungos entomopatogênicos. Ainda, a adição de tetraciclina não apresentou influência na suscetibilidade das fêmeas de carrapatos, ou seja, a redução de alguns taxons pelo antibiótico não foi suficiente para prejudicar a biologia desses artrópodes e não impactou o desenvolvimento do fungo *M. anisopliae*. A administração de antibióticos mais o tratamento com *M. anisopliae* altera a comunidade bacteriana intestinal de *R. microplus*, bem como aumenta a diversidade bacteriana. O aumento da diversidade por sua vez, pode ter sido consequência da diminuição da bactéria endossimbionte. Apesar da modificação da comunidade bacteriana intestinal, a sobrevivência de *R. microplus* não foi afetada pela interferência causada pelo fungo e antibióticos juntos.

No segundo capítulo, foi demonstrado que em *I. scapularis*, a sobrevivência de ninfas não alimentadas inoculadas com uma baixa concentração de *M. anisopliae* não foi diferente da coinfeção com o fungo e *B. burgdorferi*. Assim, a escolha de uma maior concentração de propágulos em futuras investigações é necessária. O peso do ingurgitamento desses carrapatos alimentados não foi alterado pelo tratamento com *M. anisopliae* em camundongos livres de patógenos e infectados por *Borrelia*. No entanto, esta coinfeção aumentou a resposta imune das ninfas alimentadas, mas não a carga de *Borrelia* ou a carga bacteriana. Dessa forma,

nota-se que o fungo foi suficiente para estimular uma resposta imune do carrapato, no entanto o artrópode não foi suscetível a concentração de conídios utilizada. Ainda, destaca-se aqui que *I. scapularis* pôde se alimentar após o tratamento fúngico, melhorando sua defesa contra patógenos ao mesmo tempo que promove melhores condições para *B. burgdorferi* em seu organismo. Portanto, essa relação tripartite necessita mais estudos devido a sua complexidade.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, 2014.
- ABUBAKAR, M.; PERERA, P. K.; IQBAL, A.; MANZOOR, S. Introductory Chapter: Ticks and Tick-Borne Pathogens. In: **Ticks and tick-borne pathogens**. IntechOpen, 2018.
- AFZELIUS, B. A.; ALBERTI, G.; DALLAI, R.; GODULAAND, J.; WITALINSKI, W. Virus-and Rickettsia-Infected Sperm Cells in Arthropods. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 53, p. 365-377, 1989.
- AGUILAR-DÍAZ, H.; QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; COBAXIN-CÁRDENAS, M.; SALINAS-ESTRELLA, E.; AMARO-ESTRADA, I. Advances in the study of the tick cattle microbiota and the influence on vectorial Capacity. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 2021.
- ALVES, F. M.; BERNARDO, C. C.; PAIXÃO, F. R. S.; BARRETO, L. P., LUZ, C., HUMBER, R. A., FERNANDES, É. K. Heat-stressed *Metarhizium anisopliae*: viability (in vitro) and virulence (in vivo) assessments against the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology Research**, v. 116, p. 111–121, 2017.
- ANDREOTTI, R.; DE LEÓN, A. A. P.; DOWD, S. E.; GUERRERO, F. D., BENDELE, K. G., SCOLES, G. A. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. **BMC Microbiology**, v. 11, 2011.
- ANDREOTTI, R; GARCIA, M. V; KOLLER, W. W. Controle estratégico dos carrapatos nos bovinos In: ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. (Ed.). **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília, DF: Embrapa, p- 123-133, 2019.
- BARRÉ, N.; UILENBERG, G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. 2010.
- BASTIAN, M.; HEYMANN, S.; JACOMY, M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. In: **Proceedings of the international AAAI conference on web and social media**. p. 361-362., p. 361–362, 2009.
- BLANFORD, S.; CHAN, B.H. K.; JENKINS, N.; SIM, D.; TURNER R. J. T.; READ, A.F.; THOMAS, M. B. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. **Science**, v. 308, p. 1638-1641, 2005.
- BERNARDO, C. C., BARRETO, L.P., SILVA, C.R.S., LUZ, C., ARRUDA, W., FERNANDES, E.K.K. Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. **Ticks And Tick-borne Diseases**, v. 9, p.1334-1342, 2018.
- BERRY, D; WIDDER, S. Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 219, 2014.

- BEYS-DA-SILVA, W. O.; ROSA, R. L.; BERGER, M.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A.; BITTENCOURT, V.R.E.P; SANTI, L.. Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 208, p. 107812, 2020.
- BHARADWAJ, A.; STAFFORD, K. C. Susceptibility of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) to *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) using three exposure assays in the laboratory. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 222–231, 2012.
- BOCKENSTEDT, L. K. N.; SCHWARTZ, I.; FISH, D. MyD88 deficiency enhances acquisition and transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes scapularis* ticks. **Infection and immunity**, v. 74, p. 2154-2160, 2006.
- BONNET, S. I.; BINETRUY, F.; HERNÁNDEZ-JARGUÍN, A. M.; DURON, O. The tick microbiome: Why non-pathogenic microorganisms matter in tick biology and pathogen transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** . v.7, p. 236, 2017
- BOUCIAS, D. G.; ZHOU, Y.; HUANG, S.; KEYHANI, N. O. Microbiota in insect fungal pathology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 5873-5888, 2018.
- BRENNER, A. E.; MUÑOZ-LEAL, S.; SACHAN, M.; LABRUNA, M. B.; RAGHAVAN, R. *Coxiella burnetii* and Related tick endosymbionts evolved from pathogenic ancestors. **Genome Biology and Evolution**, v. 13, 2021.
- BROWN, K.; UWIERA, R. R. E.; KALMOKOFF, M. L.; BROOKS, S. P. J.; INGLIS, G. D. Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, p. 12-24, 2017
- CABEZAS-CRUZ, A.; POLLET, T.; ESTRADA-PEÑA, A.; ALLAIN, E., BONNET, S. I., MOUTAILLER, S. Handling the microbial complexity associated to ticks. In: ABUBAKAR, M.; PERERA, P. K. edit. **Ticks and tick-borne pathogens**, IntechOpen, 2018 v. 1, 2018.
- CABEZAS-CRUZ, A.; ZWEYGARTH, E.; AGUIAR, D. M. *Ehrlichia minasensis*, an old demon with a new name. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, p. 828–829, 2019.
- CABEZAS-CRUZ, A.; ZWEYGARTH, E.; VANCOVÁ, M.; BRONISZEWSKA M.; GRUBHOFFER L.; PASSOS L. M. F.; RIBEIRO M. F. B.; ALBERDI P. *Ehrlichia minasensis* sp. nov., isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 1426–1430, 2016.
- CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN A. W., JOHNSON A. J. A. HOLMES S. P DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, p. 581–583, 2016.
- CAMARGO, M. G.; MARCIANO A. F.; SÁ, F.A.; PERINOTTO, W.M.S.; QUINELATO, S.; GÔLO, P.S.; ÂNGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p.271-276, 2014.
- CAMARGO, M.; NOGUEIRA, M.R.S.; MARCIANO, A.F.; PERINOTTO, W.M.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; SCOTT, F.B.; ANGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 38-42, 2016.

- CHAO, Y.; WANG, M.; DAI, W.; DONG F.; WANG X.; ZHANG F. Synergism between hydramethylnon and *Metarhizium anisopliae* and their influence on the gut microbiome of *blattella germanica* (L.). **Insects**, v. 11, p. 1–16, 2020.
- CHAZDON, R. L.; CHAO, A.; COLWELL, R. K; LIN, S. Y., NORDEN, N., LETCHER, S. G.; CLARK, D.B.; FINEGAN, B; ARROYO J. P. A novel statistical method for classifying habitat generalists and specialists. **Ecology**, v. 92, p. 1332–1343, 2011.
- CHOUVENC, T.; EFSTATHION, C. A.; ELLIOTT, M. L.; SU, N. Y. Extended disease resistance emerging from the faecal nest of a subterranean termite. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, 2013.
- CORRÉA, T. A.; FIOROTTI, J.; MESQUITA, E.; MEIRELLES, L. N., CAMARGO, M. G., COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; MARCIANO, A.F.; BITTERCOURT, V.R.E.P.; GOLO, P. S How dopamine influences survival and cellular immune response of *Rhipicephalus microplus* inoculated with *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Fungi**, v. 7, 2021.
- COWDRY, E. V. A group of microorganisms transmitted hereditarily in ticks and apparently unassociated with disease. *The Journal of experimental medicine*, v. 41, p. 817, 1925.
- D'AMORE, R.; IJAZ, U. Z.; SCHIRMER, M.; KENNY, J. G., GREGORY, R., DARBY, A. C., SHAKYA, M.; PODAR, M.; QUINCE, C.; HALL, N. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. **BMC Genomics**, v. 17, p. 1-20, 2016.
- DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; ALMAZAN, C.; BLOUIN, E. F. Targeting the tick-pathogen interface for novel control strategies. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 13, p. 6947-6956, 2008.
- DIUK-WASSER, M. A.; VANNIER, E.; KRAUSE, P. J. Coinfection by *Ixodes* Tick-Borne Pathogens: Ecological, epidemiological, and clinical consequences. **Trends in Parasitology**, v. 32, p. 30-42, 2016.
- DONG, Y.; MORTON J. 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.
- DURON, O.; MOREL, O.; NOËL, V.; BUYASSE, M., BINETRUY, F., LANCELOT, R., LOIRE, E.; MENARD, C.; BOUCHEZ, O.; VAVRE, F.; VIAL, L. Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. **Current Biology**, v. 28, p. 1896- 1902.e5, 2018. Cell Press.
- DURON, O.; NOËL, V.; MCCOY, K. D.; BONAZZI, M., SIDI-BOUMEDINE, K., MOREL, O., VAVRE F.; ZENNER L.; JOURDAN E.; DURAND P.; ARNATHAU C.; RENAUD F.; TRAPE J.; BIGUEZOTON A. S.; CREMACHI J.; DIETRICH M.; LEDGER E.; APPELGREN A.; DUPRAZ M.; GOMEZ-DIAZ E.; DIATTA G.; DAYO G.; ADAKAL H.; ZOUNGRANA S.; VIAL L.; CHEVILLON, C. The Recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, *Coxiella burnetii*. **PLoS Pathogens**, v. 11, 2015.
- DZEMO, W. D.; THEKISOE, O.; VUDRIKO, P. Development of acaricide resistance in tick populations of cattle: A systematic review and meta-analysis. **Heliyon**, p. e08718, 2022.
- EISEN, R. J.; EISEN, L. The Blacklegged Tick, *Ixodes scapularis*: An increasing public health concern. **Trends in Parasitology**, v. 34, p. 295-309, 2018.
- EISEN, R. J.; EISEN, L.; BEARD, C. B. County-scale distribution of *Ixodes scapularis* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in the continental United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, p. 349–386, 2016.

- ESTEVES, E.; FOGAÇA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F. D., MANSO, P. P. A., PELAJO-MACHADO, M., ... & Daffre, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 913–919, 2009.
- ESTRADA-PEÑA, A.; CABEZAS-CRUZ, A.; OBREGÓN, D. Behind taxonomic variability: The functional redundancy in the tick microbiome. **Microorganisms**, v. 8, p. 1–16, 2020.
- FILSHIE, BK. Structure and deposition of the epicuticle of the adult female cattle tick (*Boophilus microplus*). In: Hepburn, HR eds, editor/s. **The Insect Integument**. Amsterdam: Elsevier;. 193-206 24 1976.
- FANG, W.; VEGA-RODRÍGUEZ, J.; GHOSH A. K., JACOBS-LORENA M.; KANG, A.; ST LEGER, R. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. **Science**, v. 331, p. 1074-1077, 2011.
- FIOROTTI, J. P., CAMARGO, M. G., COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B., MARCIANO, A. F., FREITAS, M. C., SILVA, E. M., GÔLO, P.S., SPADACCI-MORENA, D.D., ÂNGELO, I.C. BITTENCOURT, V. R. E. P. *Rhipicephalus microplus* infected by *Metarhizium*: unveiling hemocyte quantification, GFP-fungi virulence, and ovary infection. **Parasitology Research**, v.117, p.1847-1856, 2018.
- FIOROTTI, J.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; GÔLO, P. S.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B., BITENCOURT, R. O. B., SPADACCI-MORENA, D. D., ANGELO, I.C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ultrastructural and cytotoxic effects of *Metarhizium robertsii* infection on *Rhipicephalus microplus* hemocytes. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 654, 2019.
- FIOROTTI, J.; URBANOVA, V.; GÔLO, P. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; KOPÁČEK, P. The role of complement in the tick cellular immune defense against the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 126, p. 104234 2022.
- FLORES-VILLEGAS, A. L.; CABRERA-BRAVO, M.; De FUENTES-VICENTE, J. A.; JIMÉNEZ-CORTÉS, J. G.; SALAZAR-SCHETTINO, P. M.; BUCIO-TORRES, M. I.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. Coinfection by *Trypanosoma cruzi* and a fungal pathogen increases survival of Chagasic bugs: advice against a fungal control strategy. **Bulletin of entomological research**, v. 110, p. 363-369, 2020.
- FOGAÇA, A. C.; SOUSA, G.; PAVANELO, D. B.; ESTEVES, E., MARTINS, L. A., URBANOVA, V., KOPACEK, P.; DAFFRE, S. Tick immune system: what is known, the interconnections, the gaps, and the challenges. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 628054, 2021.
- FULAR, A., SHARMA, A.K., KUMAR, S., NAGAR, G., CHIGUREE, G., RAY, D. D., GHOSH, S. Establishment of a multi-acaricide resistant reference tick strain (IVRI-V) of *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and tick-borne diseases**, v.9, p.1184-1191, 2018.
- GRADA, A.; WEINBRECHT, K. Next-generation sequencing: Methodology and application. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, 2013.
- GREAY, T. L.; GOFTON, A. W.; PAPARINI, A.; RYAN, U. M., OSKAM, C. L.; IRWIN, P. J. Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing. **Parasites and Vectors**, v. 11, p. 1-14, 2018.
- GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment

- of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.
- GRIZANOVA, E. V.; COATES, C. J.; DUBOVSKIY, I. M.; BUTT, T. M. *Metarhizium brunneum* infection dynamics differ at the cuticle interface of susceptible and tolerant morphs of *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 10, p. 999–1012, 2019.
- GULIA-NUSS, M. et al. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. **Nature communications**, v. 7, p. 1-13, 2016.
- GUIZZO, M. G.; NEUPANE, S.; KUCERA, M.; PERNER, J.; FRANTOVA, H., Vaz, I. S., OLIVEIRA, P. L.; KOPACEK, P.; ZUREK, L. Poor Unstable midgut microbiome of hard ticks contrasts with abundant and stable monospecific microbiome in ovaries. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 211, 2020.
- GUIZZO, M. G.; PARIZI, L. F.; NUNES, R. D.; SCHAMA, R., ALBANO, R. M., TIRLONI, L., Oliveira, P. L. A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–10, 2017.
- GUIZZO, M. G.; TIRLONI, L.; GONZALES, S. A.; FARBER, M. D.; BRAZ, G.; PARIZI, L. F.; SILVA, L. A. D.; VAZ Jr, I.S., Oliveira, P. L. *Coxiella* endosymbiont of *Rhipicephalus microplus* modulates tick physiology with a major impact in blood feeding capacity. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 868575, 2022.
- HAWLENA, H.; RYNKIEWICZ, E.; TOH, E.; ALFRED, A., DURDEN, L. A., HASTRITER M. W.; NELSON, D.E.; RONG, R.; MUNRO, D.; DONG, Q.; FUQUA, C.; Clay, K. The arthropod, but not the vertebrate host or its environment, dictates bacterial community composition of fleas and ticks. **ISME Journal**, v. 7, p. 221–223, 2013.
- HEISE, S. R.; ELSHAHED, M. S.; LITTLE, S. E. Bacterial diversity in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) with a focus on members of the genus rickettsia. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, p. 258–268, 2010.
- HERLEMANN, D. P. R.; LABRENZ, M.; JÜRGENS, K.; BERTILSSON, S., WANIEK, J. J., ANDERSSON, A. F. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. **ISME Journal**, v. 5, p. 1571–1579, 2011.
- HYDE, J. A. *Borrelia burgdorferi* keeps moving and carries on: A review of borrelial dissemination and invasion. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 114, 2017.
- JAIME, O.; HURTADO, B.; GIRALDO-RÍOS, C. Economic and health impact of the ticks in production animals. In: ABUBAKAR, M.; PERERA, P. K. edit. Ticks and tick-borne pathogens, IntechOpen, 2018.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. *16S* rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2761-2764, 2007.
- JONSSON, N. 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.
- KARASUYAMA, H.; MIYAKE, K.; YOSHIKAWA, S. Immunobiology of acquired resistance to ticks. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 601504, 2020.
- KAAYA, G.P.; SAMISH M.; HEDIMBI, M.; GINDIN, G.; GLAZER, I. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 55, p. 273-281, 2011.
- KIRKLAND, B. H.; WESTWOOD, G. S.; KEYHANI, N. O. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of medical entomology**, v. 41p. 705-711, 2004.

- KOPÁČEK, P.; HAJDUŠEK, O.; BUREŠOVÁ, V.; DAFFRE, S. Tick Innate Immunity. **Invertebrate Immunity**, p. 137-162, 2010.
- KUROKAWA, C.; LYNN, G. E.; PEDRA, J. H. F.; PAL, U., NARASIMHAN, S., FIKRIG, E. Interactions between *Borrelia burgdorferi* and ticks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 587-600, 2020.
- KURTZ, Z. D.; MÜLLER, C. L.; MIRALDI, E. R.; LITTMAN, D. R., BLASER, M. J., BONNEAU, R. A Sparse and compositionally robust inference of microbial ecological networks. **PLoS Computational Biology**, v. 11, p. 1–25, 2015.
- KWONG, Waldan K.; MANCENIDO, Amanda L.; MORAN, Nancy A. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honeybees. **Royal Society open science**, v. 4, p. 170003, 2017.
- LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Comparison of bioassay responses to the potential fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Lucilia cuprina*. **Veterinary Parasitology**, v. 185, p. 236–247, 2012.
- LEVY, M.; KOŁODZIEJCZYK, A. A.; THAISS, C. A.; ELINAV, E. Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, p. 219-232, 2017.
- LITTLE, E. A. H.; WILLIAMS, S. C.; STAFFORD, K. C.; LINSKE, M. A.; MOLAEI, G. Evaluating the effectiveness of an integrated tick management approach on multiple pathogen infection in *Ixodes scapularis* questing nymphs and larvae parasitizing white-footed mice. **Experimental and Applied Acarology**, v. 80, p. 127–136, 2020.
- LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. **Current Genetics**, v. 61, p. 253–261, 2015.
- MARCIANO, A. F., MASCARIN, G. M., FRANCO, R. F. F., GOLO, P. S., JARONSKI, S. T., FERNANDES, É. K. K., BITTENCOURT, V. R. E. P. Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1-11, 2021
- MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA, Í.; FERNANDES, É. K. K., LUZ, C., FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 165, p. 46-53, 2019.
- MATHER, T.; TELFORD III, S. R.; MOORE, S. I.; SPIELMAN, A. *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti*: efficiency of transmission from reservoirs to vector ticks (*Ixodes dammini*). **Experimental parasitology**, v. 70, p. 55-61, 1990.
- MATTOSO, T. C.; MOREIRA, D. D. O.; SAMUELS, R. I. Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. **Biology Letters**, v. 8, p. 461–464, 2012.
- MANSFIELD, K. L.; COOK, C.; ELLIS, R. J.; BELL-SAKYI, L.; JOHNSON, N.; ALBERDI, P.; DE LA FUENTE, J.; FOOKS, A. R. Tick-borne pathogens induce differential expression of genes promoting cell survival and host resistance in *Ixodes ricinus* cells. **Parasites & vectors**, v. 10, p. 1-12, 2017.
- MENT, D.; CHURCHILL, A. C. L.; GINDIN, G.; BELAUSOV, E., GLAZER, I., REHNER, ROT, A.; DONZELLI, B.G.G; S. A., Samish, M. Resistant ticks inhibit *Metarhizium* infection prior to haemocoel invasion by reducing fungal viability on the cuticle surface. **Environmental Microbiology**, v. 14 p. 1570–1583, 2012.
- MENT, D.; GINDIN, G.; SAMISH, M.; GLAZER, I. Comparative response of *Metarhizium brunneum* to the cuticles of susceptible and resistant hosts. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 105, 2020. John Wiley and Sons Ltd.

- MENT, D.; GINDIN, G.; SOROKER, V.; GLAZER, I., ROT, A., Samish, M. *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 132–139, 2010.
- MESQUITA, E.; MARCIANO, A. F.; CORVAL, A. R. C.; FIOROTTI, J., CORREA, T. A., QUINELATO, S., BITTENCOURT, V.R.E.P.; GOLO, P. S. Efficacy of a native isolate of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against larval tick outbreaks under semifield conditions. **BioControl**, v. 65, p. 353–362, 2020.
- MORAES, A. P. R.; VIDEIRA, S. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; BITTENCOURT, A. J. Atividade antifúngica de *Stenotrophomonas maltophilia* em larvas de *Stomoxys calcitrans*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 194–199, 2014.
- MORENO, C. X.; MOY, F.; DANIELS, T. J.; GODFREY, H. P.; CABELLO, F. C. Molecular analysis of microbial communities identified in different developmental stages of *Ixodes scapularis* ticks from Westchester and Dutchess Counties, New York. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 761–772, 2006.
- MURALI, A.; BHARGAVA, A.; WRIGHT, E. S. IDTAXA: A novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. **Microbiome**, v. 6, p. 1–14, 2018.
- NAKAO, R.; ABE, T.; NIJHOF, A. M.; YAMAMOTO, S., JONGEJAN F., IKEMURA, T., SUGIMOTO, C. A novel approach, based on BLSOMs (Batch Learning Self-Organizing Maps), to the microbiome analysis of ticks. **ISME Journal**, v. 7, p. 1003–1015, 2013.
- NARASIMHAN, S.; FIKRIG, E. Tick microbiome: The force within. **Trends in Parasitology**, v. 31, p. 315–323, 2015.
- NARASIMHAN, S.; RAJEEVAN, N.; LIU, L.; ZHAO, Y. O., HEISIG, J., PAN, J., EPPLER-EPSTEIN, R; DEPONTE, K.; FISH, D.; FIKRIG, E. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. **Cell Host and Microbe**, v. 15, p. 58–71, 2014.
- NARASIMHAN, S.; SWEI, A.; ABOUNEAMEH, S.; PAL, U., PEDRA, J. H., FIKRIG, E. Grappling with the tick microbiome. **Trends in Parasitology**, v. 37, p. 722–733, 2021.
- NCHU, F.; MANIANIA, N.K.; HASSANALI, A.; ELOFF, J.N. Performance of a *Metarhizium anisopliae*-treated semiochemical-baited trap in reducing *Amblyomma variegatum* populations in the field. **Veterinary parasitology**, v. 169, p. 367–372, 2010.
- OJEDA-CHI, M. M.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 348–354, 2010.
- OKSANEN, J., GUILLAUME BLANCHET, F., FRIENDLY, M., KINDT, R.LEGENDRE, MCGLINN, D.; MINCHIN, P.R., SIMPSON, G.L., SOLYMOS, P., STEVENS, M.H.H., SZOECs, E., WAGNER, H.; O’HARA, R. B. Vegan: Community Ecology Package. **R package version 2.5-7**, 2020.
- PFEFFER, M.; KRO’L, N.; OBIEGALA, A. Prevention and control of tick-borne anaplasmosis, cowdriosis and babesiosis in the cattle industry. **Ecology and Control of Vector-Borne Diseases**. v. 5, p.175–194, 2018.
- POWER, Mary E.; TILMAN D., ESTES, J. A.; MENGE, B.A.;BONDE, W. J.; MILLS, L. S.; DAILY, G.; CASTILLA, J. C.; LUBCHENCO, J.; PAINE, R. T. Challenges in the quest for keystones: identifying keystone species is difficult—but essential to

- understanding how loss of species will affect ecosystems. **BioScience**, v. 46, p. 609-620, 1996.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J., SCHWEER, T., YARZA, P., PEPLIES, J.; Glöckner, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 590–596, 2013.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2021.
- RADOLF, J. D.; CAIMANO, M. J.; STEVENSON, B.; HU, L. T. Of ticks, mice and men: Understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 87-99, 2012.
- RAMIREZ, J. L.; DUNLAP, C. A.; MUTURI, E. J.; BARLETTA, A. B. F.; ROONEY, A. P. Entomopathogenic fungal infection leads to temporospatial modulation of the mosquito immune system. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, p. 1–25, 2018.
- RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL’AGNOLB.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J.S; MARTINS J. R. S. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, p. 128–136, 2014.
- RECK, J.; MARKS, F. S.; RODRIGUES, R. O.; DALL’AGNOL, B., SCHEFFER, R., SOUZA, U. A., CORASSINI, V.B.; VARGAS, R.; SANTOS, J.S.; SOUZA MARTINS, J. R. 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.
- RIBEIRO, C. C. D. U.; DE AZEVEDO BAËTA, B.; DE ALMEIDA VALIM, J. R.; TEIXEIRA, R. C., CEPEDA, P. B., DA SILVA, J. B., FONSECA, A. H. Use of plastic tips in artificial feeding of *Dermacentor (Anocentor) nitens* females Neumann, 1897 (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 689–692, 2014.
- RIBEIRO-SILVA, C. S.; MUNIZ, E. R.; LIMA, V. H.; BERNARDO, C. C.; ARRUDA, W.; CASTRO, R. N.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.S.; Fernandes, É. K. Cuticular Lipids as a First Barrier Defending Ixodid Ticks against Fungal Infection. **Journal of Fungi**, v. 8, p. 1177, 2022.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, v. 117, p. 3-29, 2018.
- ROSA, R. D.; CAPELLI-PEIXOTO, J.; MESQUITA, R. D.; KALIL, S. P., POHL, P. C., BRAZ, G. R., FOGACA, A.C; DAFFRE, S. Exploring the immune signalling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: From molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 59, p. 1–14, 2016.
- ROSENBERG, R.; LINDSEY, N. P.; FISCHER, M.; GREGORY, C. J., HINCKLEY, A. F., MEAD, P. S., PETERSEN, L. R. Vital Signs: Trends in Reported Vectorborne Disease Cases — United States and Territories, 2004–2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 67p. 496, 2018.
- ROT, A.; GINDIN, G.; MENT, D.; MISHOUTCHENKO, A.; GLAZER, I.; SAMISH, M. On-host control of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae) by *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae). **Veterinary parasitology**, v. 193, p. 229-237, 2013.

- RUTH ELLIMAN, J.; OWENS, L. Confirmation that *candidatus Coxiella cheraxi* from redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) is a close relative of *Coxiella burnetii*, the agent of Q-fever. **Letters in Applied Microbiology**, v. 71, p. 320–326, 2020.
- SANTOS, L. R., GASPAR, E. B., BENAVIDES, M. V., TRENTIN, G.. Tristeza Parasitária Bovina-Medidas de controle atuais. In: ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. (Ed.). **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília, DF: Embrapa, p-87-97, 2019.
- SAMISH, M.; ROT, A.; MENT, D.; BAREL, S.; GLAZER, I.; GINDIN, G. Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. **Veterinary Parasitology** v. 206, p.258-266, 2014.
- SEGURA, J. A.; ISAZA, J. P.; BOTERO, L. E.; ALZATE, J. F.; GUTIÉRREZ, L. A. Assessment of bacterial diversity of *Rhipicephalus microplus* ticks from two livestock agroecosystems in Antioquia, Colombia. **PLoS One**, v. 15, p. e0234005, 2020.
- SCOTT, J. J.; OH, D. C.; YUCEER, M. C.; KLEPZIG, K. D., CLARDY, J., CURRIE, C. R. Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. **Science**, v. 322, p. 63, 2008.
- SILVA, F. D.; ROSSI, D. C. P.; MARTINEZ, L. R.; FRASES, S., FONSECA, F. L., CAMPOS, C. B. L., RODRIGUES, M.L; NOSANCHUK, J.D; DAFFRE, S. Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 324, p. 64–72, 2011.
- SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, 2008.
- SONENSHINE, DANIEL E.; ROE, R. MICHAEL. Ticks, people, and animals. In: SONENSHINE; ROE ed. **Biology of Ticks Volume 1**, v. 1, p. 1, 2013
- 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.
- SPIELMAN, A. Duration and Regulation of the Developmental Cycle of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 27, p. 196-201, 1990.
- STAFFORD, K.C.; ALLAN, S.A. Field applications of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for the control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 47, p. 1107-1115, 2014.
- STAFFORD, K. C.; WILLIAMS, S. C.; MOLAEI, G. Integrated pest management in controlling ticks and tick-associated diseases. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 8, p. 28, 2017.
- TOLEDO, A. V; ALIPPI, A. M.; DE, A. M. M.; LENICOV, R. Growth inhibition of *Beauveria bassiana* by bacteria isolated from the cuticular surface of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* and the planthopper, *Delphacodes kuscheli*, two important vectors of maize pathogens. **Journal of Insect Science**, v. 11, 2011.
- TOMAZI, T.; DOS SANTOS, M. V. Antimicrobial use for treatment of clinical mastitis in dairy herds from Brazil and its association with herd-level descriptors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 176, 2020.
- VALIM, J. R. DE A.; RANGEL, C. P.; BAËTA, B. DE A.; RIBEIRO, C. C. D. U., CORDEIRO, M. D., TEIXEIRA, R. C., CEPEDA, P.B.; FONSECA, A. H. D. Using plastic tips in artificial feeding of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, p. 110–114, 2017.

- VALSONI, L. M.; DE FREITAS, M. G.; BORGES, D. G. L.; BORGES, F. DE A. Status of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin, fipronil and fluzaron in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 30, p. 1–7, 2021.
- VILELA, V. L. R.; FEITOSA, T. F.; BEZERRA, R. A.; KLAFKE, G. M.; RIET-CORREA, F. Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, 2020.
- WAMITI, L. G.; KHAMIS, F. M.; ABD-ALLA, A. M. M.; OMBURA, F. L., AKUTSE, K. S., SUBRAMANIAN, ODIWUOR, S.O.; OCHIENG, S. J.; EKES, S.; MANIANIA, N. K. *Metarhizium anisopliae* infection reduces *Trypanosoma congolense* reproduction in *Glossina fuscipes fuscipes* and its ability to acquire or transmit the parasite. **BMC Microbiology**, v. 18, p. 271-278, 2018.
- WANG, C.; ST LEGER, R. J. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 6647-6652, 2006.
- WANG, X.; YANG, X.; ZHOU, F.; QIANG T. Z., CHENG, J., MICHAUD, J. P., LIU, X. Symbiotic bacteria on the cuticle protect the oriental fruit moth *Grapholita molesta* from fungal infection. **Biological Control**, v. 169, p. 104895, 2022.
- WASSERMANN, M.; SELZER, P.; STEIDLE, J. L.; MACKENSTEDT, U. Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, p. 768-771, 2016.
- WEI, G.; LAI, Y.; WANG, G.; CHEN, H., LI, F., WANG, S. Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, p. 5994–5999, 2017.
- WEINSTEIN, M.M., PREM, A., JIN, M., TANG, S., BHASIN, J. M. FIGARO: An efficient and objective tool for optimizing microbiome rRNA gene trimming parameters. **bioRxiv**, p. 610394, 2019.
- WELLER, S. J.; BALDRIDGE, G. D.; MUNDERLOH, U. G.; NODA, H., SIMSER, J., KURTTI, T. J. Phylogenetic Placement of Rickettsiae from the Ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis* **Journal of clinical microbiology**, v. 36, p. 1305-1317, 1998.
- WICKHAM, H. Data analysis. **ggplot2: elegant graphics for data analysis**, v. 35, p. 189-201, 2016.
- WILLIAMS, S.C., STAFFORD, K.C., MOLAEI, G., & LINKSE, M. A. Integrated control of nymphal *Ixodes scapularis*: Effectiveness of white-tailed deer reduction, the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, and fipronil-based rodent bait boxes. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 18, p. 55-64, 2018.
- WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5088-5090, 1977.
- WRIGHT, E. S. Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological sequence data in R. **R Journal**, v. 8, p. 352–359, 2016.
- XU, L.; DENG, J.; ZHOU, F.; CHENG, C., ZHANG, L., ZHANG, J., LU, M. Gut microbiota in an invasive bark beetle infected by a pathogenic fungus accelerates beetle mortality. **Journal of Pest Science**, v. 92, p. 343–351, 2019.
- YODER, J. A.; BENOIT, J.B.; DENLINGER, D.L.; TANK, J.L.; ZETTLER, L.W. An endosymbiotic conidial fungus, *Scopulariopsis brevicaulis*, protects the American dog

- tick, *Dermacentor variabilis*, from desiccation imposed by an entomopathogenic fungus. **Journal of invertebrate pathology**, v. 97, p. 119-127, 2008.
- ZHANG, R.; HUANG, Z.; YU, G.; ZHANG, Z. Characterization of microbiota diversity of field-collected *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) with regard to sex and blood meals. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, p. 215–223, 2019.
- ZHONG, J.; JASINSKAS, A.; BARBOUR, A. G. Antibiotic treatment of the tick vector *Amblyomma americanum* reduced reproductive fitness. **PLoS ONE**, v. 2, 2007.
- ZHOU, F.; GAO, Y.; LIU, M.; XU, L., WU, X., ZHAO, X., ZHANG, X Bacterial inhibition on *Beauveria bassiana* contributes to microbiota stability in *Delia antiqua*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, 2007.