

**UFRRJ**

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

**TESE**

**CARACTERIZAÇÃO DE RECEPTORES TOLL-*LIKE***  
**RELACIONADOS À RESPOSTA IMUNE NO CARRAPATO**  
**BOVINO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.**

**Sabrina Rita da Fonseca Rezende**

**2013**



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

**CARACTERIZAÇÃO DE RECEPTORES TOLL-*LIKE*  
RELACIONADOS À RESPOSTA IMUNE NO CARRAPATO  
BOVINO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.**

**SABRINA RITA DA FONSECA REZENDE**

*Sob a Orientação das Professoras*  
**Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**  
**Dra. Milane de Souza Leite**

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

Seropédica, RJ

Março de 2013

595.429

R467c

T

Rezende, Sabrina Rita da Fonseca, 1982-  
Caracterização de receptores Toll-like  
relacionados à resposta imune no carrapato  
bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*  
/ Sabrina Rita da Fonseca Rezende. - 2013.  
102f. : il.

Orientador: Vânia Rita Elias Pinheiro  
Bittencourt.

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

Bibliografia: f. 55-74.

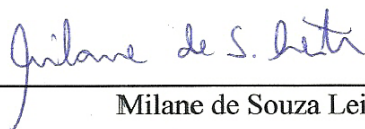
1. Carrapato - Teses. 2. Bovino - Teses.  
3. *Boophilus microplus* - Teses. 4.  
Imunidade - Teses. I. Bittencourt, Vânia  
Rita Elias Pinheiro, 1959- II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
III. Título.

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

**SABRINA RITA DA FONSECA REZENDE**

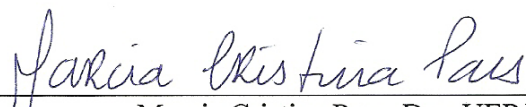
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,  
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em  
Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM 27/03/2013



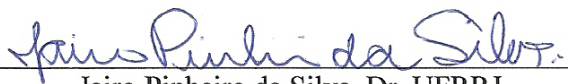
---

Milane de Souza Leite. Dra. UFRRJ



---

Marcia Cristina Paes. Dra. UERJ



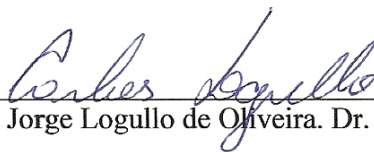
---

Jairo Pinheiro da Silva. Dr. UFRRJ



---

Fernando Ariel Genta. Dr. FIOCRUZ-RJ



---

Carlos Jorge Logullo de Oliveira. Dr. UENF

*Dedico esta obra*

*À minha família, minha mãe Silvina da Fonseca Rezende*

*meu pai Gilvandre de Castro Rezende,*

*minhas irmãs Samantha da Fonseca Rezende e Camilla da Fonseca Rezende,*

*E ao meu namorado Gabriel P. R. Gonçalves.*

*Amo vocês!!*

*"Não sei como pareço aos olhos do mundo, mas eu mesmo vejo-me como um pobre garoto que brincava na praia e se divertia em encontrar uma pedrinha mais lisa uma vez por outra, ou uma concha mais bonita do que de costume, enquanto o grande oceano da verdade se estendia totalmente inexplorado diante de mim."*

*Isaac Newton*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Silvina da Fonseca Rezende e Gilvandre de Castro Rezende, cuja palavras me faltam para expressar o quanto sou grata por tudo o que sempre fizeram por mim, mesmo com tantas dificuldades me possibilitaram chegar até aqui.

A minha irmã Samantha da Fonseca Rezende, pelo incentivo e apoio nas horas necessárias.

A minha irmã Camilla da Fonseca Rezende, pelos almoços maravilhoso, pela companhia nas horas mais difíceis, mais felizes e divertidas.

A minha avó Terezinha, as minhas madrinhas Lalad e Cadi e meus Tios e Primos que sempre estiveram junto a mim em pensamento e oração. Agradeço por todas as conversas e pelo grande carinho e amor com que sempre me trataram.

Ao meu namorado, amor da minha vida, Gabriel P. R. Gonçalves por todo carinho, amizade, apoio e ajuda para realização deste trabalho.

A professora Dra. Milane de Souza Leite, pelos ensinamentos, compreensão, orientação e experiências compartilhadas neste trabalho.

A professora Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt, pela orientação, ensinamentos, críticas, por acreditar no meu potencial, mesmo quando eu duvidei e pela amizade que compartilhamos. Ressalto o meu respeito e admiração pela sua serenidade, objetividade e competência.

A professora Dra Patrícia H. Alvarenga pela revisão da tese.

Ao professor Dr. Claudio Akio Masuda, pelo apoio, orientação, pelos seus conhecimentos compartilhado e fundamental disponibilização.

Ao professor Dr. Pedro Lagerblad e Oliveira que sempre esteve presente, contribuindo para a realização deste trabalho, disponibilizando seu laboratório.

A Ana Caroline P. Gandara e ao Felipe Dias por me apoiarem sempre e me encorajarem a continuar essa caminhada.

As minhas amigas Danubia Gonçalves e Ana Paula Aragão, pelos momentos maravilhosos compartilhados.

A professora Dra Glória Regina Cardoso Braz, IQ-UFRJ, pela ajuda na bioinformática.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Vetores – UFRRJ, Thaís Barbosa, Juliana Verdán, Frenanda Ragazzi e Wanderson Oliveira, por estarem sempre

presente me ajudando no desenvolvimento desse trabalho e dando apoio e coragem para enfrentar os problemas.

Aos amigos do Laboratório de Controle Microbiano - UFRRJ, Isabele da C. Angelo, Wendell M. de S. Perinotto, Patrícia S. Gôlo, Mariana G. Camargo, Fillipe A. de Sá, Caio J. B. Rodrigues, Allan F. Marciano, Jéssica Fiorotti, Simone B. Quinelato, Luciana Souza e Caio Monteiro, pelo apoio incondicional, amizade verdadeira e inesquecíveis momentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular do Desenvolvimento – UFRJ professora Dra. Helena Araujo, Márcio Fontenele, Márcio Buffolo, Mateus Berni, Nathália Pentagna e Amanda Câmara. Pela ajuda na realização do *wester blot* e microscopia confocal.

Aos moradores e amigos do alojamento da Pós-graduação da UFRRJ.

Ao Gil, pela atenção e amizade.

Ao assistente administrativo Arthur Santiago Jr., demais funcionários da secretaria do CPGCV e aos técnicos de laboratório Ivan e Maurício, sempre atenciosos e prestativos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela educação de qualidade, inigualável experiência de vida e belos entardeceres

A todos os funcionários da Estação Experimental W. O. Neitz que contribuíram para a manutenção dos animais nos estábulos.

A CAPES pela bolsa de doutorado.

A CAPES, CNPq, FAPERJ e INCT-EM pelo auxílio financeiro que foi primordial para a execução deste trabalho.

Aos colegas e professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho e para minha formação.



## RESUMO

REZENDE, Sabrina R. F. **Identificação e Expressão Diferencial de Receptores Toll-Like em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2013. 110p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

Os receptores Toll-like (TLR) são proteínas transmembranares altamente conservadas que desempenham papel importante no reconhecimento de patógenos. Este estudo visa identificar a possível presença e expressão diferencial de receptores Toll-like em tecidos e células importantes para a resposta imune inata do carrapato *R. (B.) microplus*. Para tal, identificamos genes de *R. (B.) microplus* que codificam homólogos de receptores Toll, denominados RmToll-like e RmToll8-like. Detectamos a presença desses receptores nos principais órgãos envolvidos na resposta imune, corpo gorduroso, hemócitos, glândula salivar e célula digestiva. A expressão gênica dos receptores Toll-like, avaliada por qPCR, mostrou modulação nos diferentes tecidos analisados, e confirmamos a expressão desses receptores pelas técnicas de *Western Blot* e microscopia confocal. Como o corpo gorduroso representa um importante órgão de defesa imune e apresentou uma maior modulação dos receptores estudados nós optamos por investigar mais profundamente esses receptores neste tecido. No corpo gorduroso, esses receptores foram encontrados especificamente nos trofócitos arredondados, em suas membranas celulares e vesículas intracelulares. A expressão gênica dos receptores Toll-like foi avaliada por qPCR 6, 24 e 48 horas após os desafios com o fungo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. A transcrição de RmToll-like foi modulada positivamente 48 horas após o desafio com *B. bassiana*, mas não observamos modulação do gene RmToll8-like nos diferentes tratamentos e em função dos tempos de exposição ao fungo. Entretanto, ao avaliarmos a expressão das proteínas desses receptores dos carrapatos desafiados com o fungo, não observamos diferença entre os tratamentos e nos tempos analisados. Quando investigamos uma cepa menos virulenta do fungo observamos que RmToll-like foi modulada positivamente nos tempos de 24h e 48h, sendo esta modulação menor quando comparada com a modulação pela cepa mais virulenta. Em relação ao RmToll8-like não observamos diferença entre os tratamentos e nos tempos analisados. A expressão dos genes de peptídeos antimicrobianos também foi modulada pelo desafio com fungo, contudo indicando uma possível imunossupressão, mas investigações futuras com novos tempos de desafio devem ser consideradas. Avaliando o efeitos de uma molécula padrão de superfície de patógenos, o zimosan, observamos um aumento significativo na expressão do RmToll-like, mas não em relação ao RmToll8-like. Avaliamos a expressão das proteínas dos receptores em carrapatos desafiados com zimosan, não observamos diferença entre os tratamentos e nos tempos analisados. O presente trabalho mostra pela primeira vez a presença de receptores Toll-like em carrapatos, e relata a expressão diferencial entre diferentes tecidos engajados na resposta imune inata e modulação por desafios imunológicos neste artrópode.

**Palavras-Chave:** Receptores Toll-Like, imunidade inata, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Beauveria bassiana*.

## ABSTRACT

REZENDE, Sabrina R. F. **Identification and Differential Expression of Toll-Like Receptors in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2013. 110p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Toll-like receptors (TLR) are highly conserved transmembrane proteins that play important roles in pathogen recognition. This study aims to identify the presence and differential expression of Toll-like receptors in tissues and cells that are important to the innate immune response of the tick *R. (B.) microplus*. For this, we identified genes of *R. (B.) microplus* encoding Toll receptors homologues, which we called RmToll-like and RmToll8-like. We detected the presence of these receptors in organs involved in immune response, such as fat body, hemocytes, salivary glands and digestive cells. Gene expression of Toll-like receptors was evaluated by qPCR and differential expression in the different tissues analyzed. We confirmed the expression of these receptors by western blot and confocal microscopy. Fat body had the greatest modulation of receptors studied, we have chosen to further investigate these receptors in this tissue. In fat body, these receptors were found specifically in round-shaped trophocytes cell membranes and intracellular vesicles. Gene expression of Toll-like receptors was assessed by qPCR 6, 24 and 48 hours after the challenges with the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. Transcription of RmToll-like was positively modulated 48 hours after challenge with *B. bassiana*, but we did not observe modulation of gene RmToll8-like in the various treatments depending on the time of exposure to the fungi. However, when we evaluated the protein expression of these receptors in ticks challenged with the fungi, no significant difference between treatments and the times analyzed was observed. When we investigated a less virulent strain of fungi we observed that RmToll-like expression was positively modulated after 24h and 48h of infection, this modulation being smaller when compared with those from the more virulent strain. Regarding RmToll8-like we not observed differences between treatments and the times analyzed. The gene expression of antimicrobial peptides was also modulated by the challenge with the fungi, though indicating a possible immunosuppression, but further investigations with new times of challenge should be considered. Evaluating the effects of a pathogen-associated molecular patterns, zymosan, we observed a significant increase in expression of RmToll-like, but not for RmToll8-like. We also evaluated the expression of the corresponding proteins in ticks challenged with zymosan, but no significant difference between treatments and the times analyzed was observed. This study shows for the first time the presence of Toll-like receptors in ticks, and reports the differential expression between different tissues engaged in the innate immune response modulation and immune challenges in this arthropod.

**Keywords:** Toll-Like Receptors, innate immunity, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Beauveria bassiana*.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos gene específico utilizado na qPCR. Desenhados usando <i>primer-blast</i> ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast</a> ) e sintetizados pela <i>Invitrogen life Technologies</i> .....	25
---	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema simplificado de fêmea completamente ingurgitada e macho de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*..... 3
- Figura 2.** Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fase parasitária e fase de vida livre. Adaptado de ANDREOTTI e MALAVARI, 2001..... 5
- Figura 3.** Resumo esquemático do sistema de defesa de artrópodes. A detecção do patógeno leva a produção de um grande espectro de moléculas de defesa em tecidos que respondem imunologicamente (modificado de LEMAITRE e HOFFMANN, 2007)..... 14
- Figura 4.** Desenho esquemático da Via toll de *Drosophila melanogaster* modificado de LEMAITRE e HOFFMANN, 2007)..... 21
- Figura 5.** Esquema das seqüências das proteínas RmToll-like (A) e RmToll8-like (B) e suas regiões conservadas LRR\_8 (Repetição Rica em Leucina), LRRCT (Repetição Rica em Leucina domínio C-terminal), TIR (Domínio TIR Toll/receptor interleucina-1) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)..... 30
- Figura 6.** A árvore filogenética construída a partir do alinhamento das sequencias obtidas no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, de *Drosophila melanogaster* (Dm), *Aedes aegypti* (Aa), *Ixodes scapularis* (Ix), *Homo sapiens* (Hs), *Anopheles gambiae* (Ag) e *Rhipicephalus pulchellus* (Rp). Utilizou-se o algoritmo baseado no método de “Neighbour-joining”, através do método de comparação de nucleotídeos de Jukes-Cantor e analisadas pelo método de bootstrap com 500 replicações, através do programa Mega 5.0. Em destaque ♦ as seqüências de proteínas dos dois homólogos *R. (B.) microplus* (RmToll-like e RmToll8-like)..... 31
- Figura 7.** Proteína Toll-like em embrião, célula digestiva e corpo gorduroso das fêmeas totalmente ingurgitadas e em glândula salivar de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por *Western blot*. 40 µg de proteína separadas por gel 10% SDS-PAGE (a) amostras sem Dtt e (b) amostras com Dtt. As amostras foram eletrotransferidas para membrana de PVDF (Biorad). As membranas foram incubadas com anticorpo primário policlonal, feito em coelho, anti-Toll (d-300) (Santa Cruz) na diluição 1:500, por uma noite a 4 °C. Em seguida incubadas com anticorpo secundário, anti-coelho conjugado a peroxidase na diluição 1:2.000. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com o substrato chemoluminescent (Pierce) durante 4 minutos à temperatura ambiente, e, em seguida, exposto a filme Bio Max light-1 (Kodak)..... 32
- Figura 8.** Imunomarcaçã de proteínas Toll-Like (seta) em embriões de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (A e B) incubados com o anticorpo policlonal primário de coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) 1:100 (Toll). Como controle foi utilizado anticorpo policlonal primário camundongo anti-p-Tyrosina (Cell Signaling) 1:400 (p-Tyr) e para marcação do núcleo DAPI, 1:500 (Dapi). Anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 647, 1:400. **Merge** - sobreposição das imagens. Imagens fotografadas usando microscópio confocal

Leica SP5. Barra de escala: **A**-20µm, **B**-40µm..... 34

**Figura 9.** Imunomarcção de proteínas Toll-Like em célula digestiva de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* incubada com o anticorpo policlonal primário coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) 1:100 (**Toll**). Como controle foi utilizado anticorpo policlonal primário camundongo anti-p-Tyrosina (Cell Signaling) 1:400 (**p-Tyr**) e para marcação do núcleo DAPI, 1:500 (**Dapi**). Anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho e Alexa Fluor 647 burro anti-camundongo, 1:400 (**A**). Célula digestiva incubada com anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 647, 1:400 (**B**). **Merge** - sobreposição das imagens. Imagens fotografadas usando microscópio confocal Leica SP5. Barra de escala: **A-B**-40µm..... 35

**Figura 10.** Imunomarcção de proteínas Toll-Like em glândula salivar de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Proteína Toll difusa no citoplasma (cabeça de seta) e proteína Toll concentrada nas vesículas intracelulares em parte, co-localizada com coloração de fosfo-tirosina (seta). Glândulas salivares foram incubadas com o anticorpo policlonal primário coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) 1:100 (**Toll**). Como controle foi utilizado anticorpo policlonal primário camundongo anti-p-Tyrosina (Cell Signaling) 1:400 (**p-Tyr**) e para marcação do núcleo DAPI, 1:500 (**Dapi**). Anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho e Alexa Fluor 647 burro anti-camundongo, 1:400 (**A**). Glândula salivar incubada com anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 647, 1:400 (**B**). **Merge** - sobreposição das imagens. Imagens fotografadas usando microscópio confocal Leica SP5. Barra de escala: **A-B**-40µm..... 36

**Figura 11.** Imunomarcção de proteínas Toll-Like em corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Proteína toll está presente em trofócitos arredondados, distribuídos na membrana plasmática (seta) e em alguns trofócitos arredondado a marcação é restrita a vesículas intracelulares (cabeça de seta) parcialmente co-localizadas com coloração fosfo-tirosina. Corpo gorduroso foi incubado com o anticorpo policlonal primário coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) 1:100 (**Toll**). Como controle foi utilizado anticorpo policlonal primário camundongo anti-p-Tyrosina (Cell Signaling) 1:400 (**p-Tyr**) e para marcação do núcleo DAPI, 1:500 (**Dapi**). Anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho e Alexa Fluor 647 burro anti-camundongo, 1:400 (**A e B**). Corpo gorduroso incubado com anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 647, 1:400 (**C**). **Merge** - sobreposição das imagens. Imagens fotografadas usando microscópio confocal Leica SP5. Barra de escala: **A-B**-20µm, **C**-40µm..... 37

**Figura 12.** Aumento da expressão dos genes *RmToll-like* (a) e *RmToll8-like* (b) por qPCR em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6, 24 e 48 horas após a queda dos carrapatos do bovino. RNA obtido de 4 carrapatos/pool em três experimentos independentes.  $\beta$ - actina foi utilizada como normalizador. Os dados são mostrados média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0.05$ ; one-way ANOVA; teste de Tukey..... 38

**Figura 13.** *RmToll-like* é mais expresso em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que *RmToll8-like*, 6, 24 e 48 horas após a queda

dos carrapatos do bovino. RNA obtido de 4 carrapatos/pool em três experimentos independentes, análise da expressão por q-PCR.  $\beta$ - actina foi utilizada como normalizador. Os dados mostrados são média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0.05$ ; one-way ANOVA; teste de Tukey..... 38

**Figura 14.** Ausência de receptor Toll-like em *Beauveria bassiana*. Eletroforese em gel de agarose 1,8% de produtos de amplificação por RT-PCR de cDNA de *Beauveria bassiana* 986 e cDNA de corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Linhas 1, 3, 5 e 7 amostras com cDNA de *Beauveria bassiana*, Linhas 2, 4, 6 e 8 controle negativo sem o cDNA de *Beauveria bassiana*. Linha 9 amostras de cDNA de corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e 10 amostras sem o cDNA de corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* incubados com  $\beta$ -Actina utilizado como controle. M- marcador de peso molecular de 100pb..... 39

**Figura 15.** Mortalidade de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* após o tratamento com *Beauveria bassiana*. (■) Não injetado; (●) PBS; (▲) *Beauveria bassiana* inativada ( $10^6$  conidi.  $\text{mL}^{-1}$ ); (◆) *Beauveria bassiana* ( $10^6$  conidios.  $\text{mL}^{-1}$ ). Foram usados 15 carrapatos por tratamento, observados durante 20 dias. Comparações com controles foram feitos usando o teste de análise Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. \*\*\*  $p < 0,001$ ..... 40

**Figura 16.** Expressão dos genes RmToll-like (a) e RmToll8-like (b) por qPCR em corpo gorduroso, hemócitos e célula digestiva de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6 horas após o tratamento com suspensão de *Beauveria bassiana* 986 na concentração de  $10^6$  conidios.  $\text{mL}^{-1}$ . Foram dissecados 15 carrapatos/pool para hemócito e 4 carrapatos/pool para célula digestiva e corpo gorduroso.  $\beta$ - actina foi utilizada como normalizador. Os dados são mostrados como media  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; one-way ANOVA; teste de Tukey. N=3..... 40

**Figura 17.** Aumento da expressão de RmToll-like em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 48 horas após o desafio com *Beauveria bassiana*. Expressão dos genes RmToll-like (a) e RmToll8-like (b) por qPCR em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6, 24 e 48 horas após o tratamento com PBS, suspensão na concentração  $10^6$  conidios.  $\text{mL}^{-1}$  de *Beauveria bassiana* 986 inativada pelo calor e *B. bassiana* 986. Foram dissecados 4 carrapatos/pool em três experimentos independentes.  $\beta$ - actina foi utilizada como normalizador. Os dados são mostrados  $\pm$  erro padrão.\*\*\*  $p < 0,001$ ; one-way ANOVA; teste de Tukey..... 41

**Figura 18. (a)** Western Blot em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6 e 48 horas após o tratamento: não injetado (NI), PBS, suspensão na concentração  $10^6$  conidios.  $\text{mL}^{-1}$  de *Beauveria bassiana* inativada (BbI) pelo calor e *Beauveria bassiana* (Bb). 40  $\mu\text{g}$  de proteína foram separados por 10% SDS-PAGE e eletrotransferidas para membrana de PVDF (Biorad). Membranas foram incubadas com anticorpo primário policlonal, feito em coelho, anti-Toll (d-300) (Santa Cruz), 1:500, por uma noite a 4 °C. Em seguida incubadas com anticorpo secundário, anti-coelho conjugado a peroxidase, 1:2.000. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com o substrato chemoluminescent (Pierce) durante 4 min à temperatura ambiente, e, em seguida, exposto a filme Bio Max light-1 (Kodak). **(b)** Os níveis de proteína Toll foram determinadas por análise densitométrica em computador utilizando

a função histograma de *Photoshop* e normalizados contra tubulina. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão. Comparações com controles foram feitos usando a análise estatística one-way ANOVA, teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ ..... 42

**Figura 19.** Imunomarcção de proteínas Toll-Like em corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6 h após os tratamentos: (A) não injetado, (B) inoculado com PBS, (C) inoculado com suspensão  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana* inativada e (D) inoculado com suspensão  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana*. Incubado com o anticorpo policlonal primário coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) 1:100 (Toll). Como controle foi utilizado anticorpo policlonal primário camundongo anti-p-Tyrosina (Cell Signaling) 1:400 (p-Tyr) e para marcação do núcleo DAPI, 1:500 (Dapi). Anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho e Alexa Fluor 647 burro anti-camundongo, 1:400. Merge - sobreposição das imagens. Imagens fotografadas usando microscópio confocal Leica SP5. Barra de escala: A-20 $\mu$ m, B-C-40 $\mu$ m..... 43

**Figura 20.** Imunomarcção de proteínas Toll-Like em corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 48 h após os tratamentos: (A) não injetado, (B) inoculado com PBS, (C) inoculado com suspensão  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana* inativada e (D) inoculado com suspensão  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana*. Incubado com o anticorpo policlonal primário coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) 1:100 (Toll). Como controle foi utilizado anticorpo policlonal primário camundongo anti-p-Tyrosina (Cell Signaling) 1:400 (p-Tyr) e para marcação do núcleo DAPI, 1:500 (Dapi). Anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho e Alexa Fluor 647 burro anti-camundongo, 1:400. Merge - sobreposição das imagens. Imagens fotografadas usando microscópio confocal Leica SP5. Barra de escala: A-B-C 20 $\mu$ m..... 44

**Figura 21.** Expressão de peptídeos antimicrobianos em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6, 24 e 48 horas após o tratamento com PBS, suspensão na concentração  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana* inativada pelo calor e *Beauveria bassiana*. (a) Ixodidina, (b) Drosomicina-like, (c) Defensina e (d) Microplusina. Foram dissecados 4 carrapatos/pool em três experimentos independentes e as amostras analisadas por qPCR.  $\beta$ - actina foi utilizada como normalizador. Os dados mostrados são média  $\pm$  erro padrão.\*  $p < 0,05$ ; one-way ANOVA; teste de Tukey..... 45

**Figura 22.** Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* desafiadas com *Beauveria bassiana* 22. Expressão dos genes RmToll-like (a) e RmToll8-like (b) por qPCR em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 24 e 48 horas após o tratamento com PBS, suspensão na concentração  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana* 22 inativada pelo calor e *Beauveria bassiana* 22. Foram dissecados 4 carrapatos/pool em.  $\beta$ - actina foi utilizada como normalizador. Os dados são mostrados  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; one-way ANOVA; teste de Tukey..... 46

**Figura 23.** Efeito de diferentes tratamentos na sobrevivência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: (●) Não injetado; (■) PBS; (▲) picado; (▼) Zimosan 5 $\mu$ g; (◆) Zimosan 25 $\mu$ g; (⊙) Zimosan 50 $\mu$ g. Foram usado 15 carrapatos por tratamento, observados durante 25 dias. Comparações com controles foram feitos usando o teste de

análise Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. \*\*\*  $p < 0,001$ ..... 47

**Figura 24.** Aumento da expressão de RmToll-like em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6 horas após o desafio com zimosan. Expressão dos genes RmToll-like (a) e RmToll8-like (b) por qPCR em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 3, 6 e 24 horas após o tratamento não injetado, PBS e Zimosan 5  $\mu$ g. Foram dissecados 4 carrapatos/pool.  $\beta$ - actina foi utilizada como normalizador. .... 48

**Figura 25. (a)** Western blot em corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6, 24 e 48 horas após o tratamento: não injetado (1), PBS (2) e Zimosan 5  $\mu$ g (3). 40  $\mu$ g de proteína foram separados por 10% SDS-PAGE e eletrotransferidas para membrana de PVDF (Biorad). As membranas foram incubadas anticorpo primário policlonal, feito em coelho, anti-Toll (d-300) (Santa Cruz) na diluição 1:500, por uma noite a 4 °C. Em seguida incubadas com anticorpo secundário, anti-coelho conjugado a peroxidase na diluição 1:2.000. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com o substrato chemoluminescent (Pierce) durante 4 minutos à temperatura ambiente, e, em seguida, exposto a filme Bio Max light-1 (Kodak). **(b)** Os níveis de proteína Toll foram determinadas por análise densitométrica em computadores utilizando a função histograma de *Photoshop* e normalizados contra tubulina. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão. Comparações com controles foram feitos usando one-way ANOVA; teste de Tukey, \*  $p < 0.05$ ..... 48



## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C - graus Celsius

± - mais ou menos

≥ - maior ou igual

B.O.D. - estufa tipo Demanda Biológica de Oxigênio

Bb - *Beauveria bassiana*

Bbi - *Beauveria bassiana* inativada

BDA - Batata, Dextrose e Agar

BRP - proteínas responsivas a bactérias (*Bacteria responsive proteins*)

BSA - albumina de soro bovino

BYC - Pró cathepsina de ovos de *Boophilus* (*Boophilus yolk pro-cathepsin*.)

cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar

CLIPs - Serino proteases com domínios clip

CTLs - lectinas do tipo C (*C-type lectins*)

Da - Daltons

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

Dif - Fator imune homólogo à dorsal (*Dorsal immune factor*)

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DTT - Dithiothreitol

ERO - espécies reativas de oxigênio

EST - sequências expressas marcadas (*expressed sequences tag*)

FBN - proteínas com domínio do tipo fibrinogênio

FREPs - Proteínas do tipo fibrinogênio (*Fibrinogen-related proteins*)

FT - fatores de transcrição

g - gramas

GNBP - proteínas que se ligam a bactéria gram-negativa (*Gram-negative bacterial-binding proteins*)

h - hora

IκB: Inibidor do NF-κB

IMD - deficiência imunológica (*Immune Deficiency*)

INCT-EM - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular

JAK - Janus quinase

JAK-STAT - *Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription*

kDa - kilodaltons

kV - kilovolts

LPS - lipopolissacarídeos

LRR - proteínas contendo domínios ricos em leucina (*Leucine rich-repeat*)

M - molar

mA - miliamper

mg - miligrama

min - minuto

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

NF- $\kappa$ B - Fator nuclear kappa 5 (*Nuclear factor kappa B*)

NI - Não injetado

PAM - peptídeos antimicrobianos

PAMP - padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogens associated molecular patterns*)

PBS - solução salina tamponada

PBT - solução salina tamponada contendo Tween

PGN - peptidoglicanos

PGRP - proteínas que reconhecem peptidoglicanos (*Peptidoglycan recognition proteins*)

PGRPLC - proteína reconhedora de peptidoglicana de cadeia longa (*Peptidoglycan recognition protein long chain*)

pH - potencial hidrogeniônico

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsufonil

PRR - receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors*)

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RNA - Ácido ribonucléico (*Ribonucleic acid*)

RNA<sub>m</sub> - Ácido ribonucléico mensageiro

RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase-Trancryptase Reversa

s - segundo

SDS - sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels electrophoresis

STAT - Transdutor de sinal e ativador de transcrição (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)

TEP - Proteína rica em thio-ester (*Thioester-containing protein*)

TIR - receptor Toll/Interleucina 1 (*Toll/interleukin-1 receptor*)

TLR - receptores do tipo Toll (*Toll-Like Receptor*)

trC - trofócito cúbico

Tris - Trishydroxymethylaminomethane

trR - trofócito arredondado

UR - umidade relativa

V - volts

VTDCE - cisteíno endopeptidases envolvidas na degradação de vitelina (*Vitellin-degrading cysteine endopeptidase*)

W - watts

µg - micrograma

µL - microlitro

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1	<i>Rhipichephalus (Boophilus) microplus</i> .....	3
2.2	Ciclo de Vida.....	4
2.3	Importância Econômica.....	5
2.4	Vacinas Contra Carrapatos.....	6
2.5	Controle Químico.....	8
2.6	Controle Microbiano.....	9
2.6.1	Fungos entomopatgênicos.....	10
2.6.1.1	<i>Beauveria bassiana</i> .....	11
2.7	Sistema Imune de Artrópodes.....	12
2.7.1	Mecanismos de defesa celular.....	14
2.7.2	Mecanismos de defesa humoral.....	16
2.7.2.1	Peptídeos antimicrobianos.....	16
2.7.3	Regulação do sistema imune.....	17
2.7.3.1	Via JAK-STAT.....	18
2.7.3.2	Via IMD.....	19
2.7.3.3	Via Toll.....	19
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1	Carrapatos.....	22
3.2	Identificação e Alinhamento de Receptores Toll-Like e suas Regiões TIR....	22
2.3	Coleta da Hemolinfa.....	23
3.4	Dissecção do Corpo Gorduroso.....	23
3.5	Dissecção de Célula Digestiva.....	23
3.6	Dissecção de Glândula Salivar.....	24
3.7	Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) de Células e Tecidos de Carrapato.....	24
3.8	Western Blot.....	25
3.9	Marcação com Anticorpo – Microscopia Confocal.....	26
3.10	Obtenção e Manutenção dos Isolados Fúngicos.....	26

3.11	Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase-Trascriptase Reversa (RT-PCR) de <i>B. bassiana</i> 986.....	27
3.12	Elaboração das Suspensões e Quantificação dos Inóculos.....	27
3.13	Viabilidade das Suspensões de Conídios.....	27
3.14	Bioensaio com Teleógenas desafiadas com <i>Beauveria bassiana</i> .....	27
3.15	Reisolamento do Isolado Fúngico após o Bioensaio.....	28
3.16	Bioensaio com Teleógenas desafiadas com Zimosan.....	28
3.17	Curva de Sobrevivência.....	29
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	30
4.1	Identificação e Alinhamento de Receptores Toll-Like e suas Regiões TIR....	30
4.2	Toll-Like em Carrapato.....	32
4.3	Toll-Like em Corpo Gorduroso.....	38
4.4	Toll-Like em <i>B. bassiana</i> 986.....	39
4.5	Curva de Sobrevivência de Carrapatos Tratados com <i>B. Bassiana</i> 986.....	39
4.6	Toll-Like em Carrapatos Tratados com <i>B. Bassiana</i> 986.....	40
4.7	Peptídeos Antimicrobianos em Carrapatos Tratados com <i>B. Bassiana</i> 986....	45
4.8	Toll-Like em Carrapatos Tratados com <i>B. Bassiana</i> 22.....	46
4.9	Curva de Sobrevivência de Carrapatos Tratados com Zimosan.....	46
4.10	Toll-Like em Carrapatos Tratados com Zimosan.....	47
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	49
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	54
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	55
8.	<b>ANEXOS</b> .....	74

## 1. INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodida) (MURRELL; BARKER, 2003), é um importante ectoparasito de bovinos. Porém, estes também pode ser encontrado parasitando outros mamíferos, utilizando-os como hospedeiros alternativos, mas sem completar seu ciclo de vida (GONZALES, 1974; PEREIRA, 1980). Encontra-se amplamente distribuído nas regiões de climas tropical e subtropical.

No Brasil, estima-se que 80% do rebanho bovino encontra-se infestado pelo *R. (B.) microplus* o que leva a um prejuízo de cerca de dois bilhões de dólares anuais, devido à diminuição do ganho de peso, queda na produção de leite, carne e couro e transmissão de agentes patogênicos causadores da babesiose e anaplasmose, que podem acarretar a morte, além dos elevados custos com o controle e contratação de mão-de-obra associada (GRISI et al., 2002).

Além do impacto econômico, o uso contínuo de acaricidas químicos para o controle do carrapato tem muitos efeitos colaterais negativos, incluindo a seleção de populações de carrapatos resistentes a produtos químicos, bem como contaminação de alimentos e de ambiente. Por estas razões, os métodos alternativos e sustentáveis para o controle do carrapato, incluindo ferramentas biológicas (BITTENCOURT et al., 1996; FERNANDES et al, 2011) e seleção de possíveis alvos para testes de vacinas (SEIXAS et al, 2012) tem sido investigados.

Quando agentes patogênicos conseguem transpor as barreiras iniciais e atingir o interior do corpo dos invertebrados uma série de reações é iniciada no organismo. Estas reações constituem a resposta imune e podem ser classificadas em celulares e humorais (GILLESPIE et al., 1997; OMOTO; ALVES, 1998; LAVINE; STRAND, 2002; LEVASHINA, 2004).

A imunidade celular é executada pelos hemócitos e compreende fagocitose, nodulação e encapsulamento (IWANAGA; LEE, 2005; MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009). Moléculas efetoras da resposta imune inata como as espécies reativas de oxigênio (RYU et al, 2006; HA et al, 2005a, OLIVEIRA et al, 2011) e peptídeos antimicrobianos são produzidas e liberadas após ativação de vias de transcrição de sinal como Toll, *Immune Deficiency* (IMD) e *Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK-STAT).

A primeira identificação de receptor Toll como um ativador da resposta imune em uma linhagem de células de *Drosophila* foi publicada em 1995 (ROSETTO et al., 1995). Em 1997 foi identificado e caracterizado um homólogo da proteína Toll em humanos, sendo denominado de receptor Toll-like (MEDZHITOV et al., 1997a). A partir de 1997, dez receptores Toll humanos foram identificados e classificados como *Toll-Like Receptor* (TLR), estabelecendo o papel da via Toll de *Drosophila*, como uma cascata de sinalização evolutivamente conservada. No entanto, acredita-se que TLRs de mamíferos não têm um papel no desenvolvimento, enquanto que a via de Toll de *Drosophila* está envolvida tanto na imunidade quanto em processos de desenvolvimento (VALANNE et al, 2011). Em artrópodes, o conhecimento sobre TLR é baseado em dados obtidos com *Drosophila*.

A via de sinalização Toll é desencadeada pela ligação de microorganismos, como bactérias ou fungos, a receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors* - PRR) proteínas que reconhecem peptidoglicanos (*Peptidoglycan recognition proteins* - PGRPs) e proteínas que se ligam a bactérias gram-negativa (*Gram-negative bacterial-binding proteins* – GNBPs). Essa ligação ativa uma cascata de serino-proteases que cliva a proteína Spatzle. A ligação da Spatzle ao receptor Toll faz com que o receptor sofra

alterações conformacionais que resultam no recrutamento de proteínas envolvidas na via de degradação proteolítica de Cactus. A degradação desse repressor negativo da via permite que as proteínas Dorsal (maioria dos artrópodes) e Dif (*Drosophila*), se transloquem para o núcleo e promovam a transcrição de genes efetores, como por exemplo, os peptídeos antimicrobianos (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; VALANNE et al, 2011).

O objetivo no presente trabalho foi identificar a presença de receptores Toll-like no carrapato *R. (B.) microplus*. Avaliar a expressão diferencial desses genes em tecidos e células importantes, para a resposta imune inata do carrapato *R. (B.) microplus* em resposta a infecção artificial com o fungo entomopatogênico *B. Bassiana* e a desafios com zimosan. E fornecer uma visão adicional para o julgamento de novos alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas contra o carrapato *R. (B.) microplus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

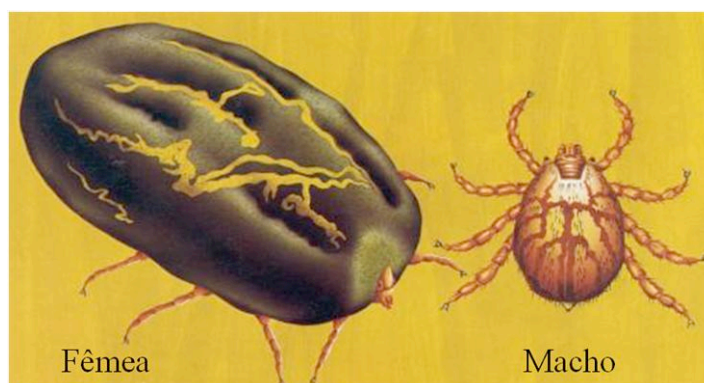
### 2.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Carrapatos são artrópodes estritamente hematófagos encontrados em todas as regiões terrestres do planeta. Estes parasitos estão entre os mais importantes vetores de doenças humanas e animais.

O carrapato *R. (B.) microplus* Canestrini, 1888 (MURREL; BARKER, 2003) pertence ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida, Subordem Metastigmata e Família Ixodidae. Este carrapato é um importante ectoparasito de bovinos, sendo uma das espécies mais relevantes para pecuária do nosso país (BITTENCOURT, 2000). Em 2003, o carrapato até então, denominado *Boophilus microplus* foi reclassificado, com base em análises moleculares e morfológicas, como pertencente ao gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*, com a nomenclatura de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL; BARKER, 2003).

Embora conhecido popularmente como “carrapato bovino”, *R. (B.) microplus* pode parasitar outros animais, incluindo o homem quando em altas infestações na pastagem (GONZÁLES, 1974; PEREIRA, 1980). Alguns fatores como a idade, gênero e estado nutricional estão relacionados com a sensibilidade do bovino ao carrapato (SUTHERST et al., 1979, 1983; STEAR et al., 1984), porém a raça é um dos fatores de maior importância sendo amplamente discutido na literatura, sendo maiores as infestações em *Bos taurus* e menores em *Bos indicus*, pois quanto maior o grau de sangue zebuino, maior a resistência ao carrapato (VILLARES, 1941; WHARTON et al., 1970; UTECH et al., 1978; MORAES et al., 1986; OLIVEIRA; ALENCAR et al., 1990, SILVA et al., 2010).

Por sua grande importância médica e veterinária, os carrapatos são de grande interesse para estudos científicos e numerosas investigações têm reportado detalhes da sistemática, morfologia e ecologia destes parasitos. Nas últimas décadas do século 20, em particular, foram muitos os relatos descrevendo os fundamentos da genética, ultraestrutura, fisiologia e bioquímica dos carrapatos (SONENSHINE, 1991; LARA et al., 2005; CITELLI et al., 2007). Pereira e Labruna (2008), baseando-se em descrições de chaves de identificação de alguns autores, estabeleceram as dimensões morfológicas de *R. (B.) microplus*. Os machos são pequenos de coloração castanho-amarelada até marrom-avermelhada e podem chegar a 2,5mm de comprimento e 1,4mm de largura. As fêmeas em geral atingem 2,5mm de comprimento e até 1,6mm de largura antes de ingurgitar. Após o ingurgitamento total podem chegar a 13mm de comprimento por 8mm de largura (**Figura 1**).



**Figura 1.** Esquema simplificado de fêmea completamente ingurgitada e macho de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.



Oliver (1989) sugere que os carrapatos possam ter surgido no período Devoniano (350-400 milhões de anos atrás). Supõe-se que quando os répteis se ramificaram em numerosas formas de vida, preenchendo nichos aquáticos e terrestres, os carrapatos mais primitivos que os parasitavam evoluíram em duas principais famílias, Argasidae e Ixodidae. Após o aparecimento de uma ligação por terra entre o continente africano e a Eurásia, estes carrapatos se irradiaram para a Ásia e Europa (MURRELL; CAMPBELL; BARKER, 2001).

A espécie *R. (B.) microplus* originou-se provavelmente na Ásia, quando mamíferos e pássaros substituíram os répteis como vertebrados dominantes, já no período terciário (HOOGSTRAAL; WASSEF, 1985). A entrada destas espécies no continente americano se deu provavelmente no século dezenove com a chegada de animais vindos do velho mundo. O *R. (B.) microplus* é uma das espécies de carrapato com maior distribuição mundial, em função das expedições exploradoras registradas na história, com a movimentação de animais e mercadorias, ocorreu a sua introdução e expansão na maioria das regiões tropicais e subtropicais: Austrália, México, América Central, América do Sul e África, tendo se estabelecido dentro dos climas demarcados pelos paralelos 32° Norte e 32° Sul (NUÑES et al., 1982).

No Brasil, o *R. (B.) microplus* foi introduzido junto com os primeiros bovinos trazidos pelos colonizadores, onde se adaptou perfeitamente ao nosso clima tropical, onde o calor e a umidade propiciaram condições favoráveis à sobrevivência e manutenção da espécie (POWEL; REID, 1982), distribuindo-se por todo o território nacional, com algumas poucas exceções das regiões que possuem baixa precipitação pluviométrica e quanto a raça de bovinos explorada (GONZALES, 1995; BARCI, 1997; GONZÁLES, 2002; ESTRADA-PEÑA et al., 2006).

## 2.2 Ciclo de Vida

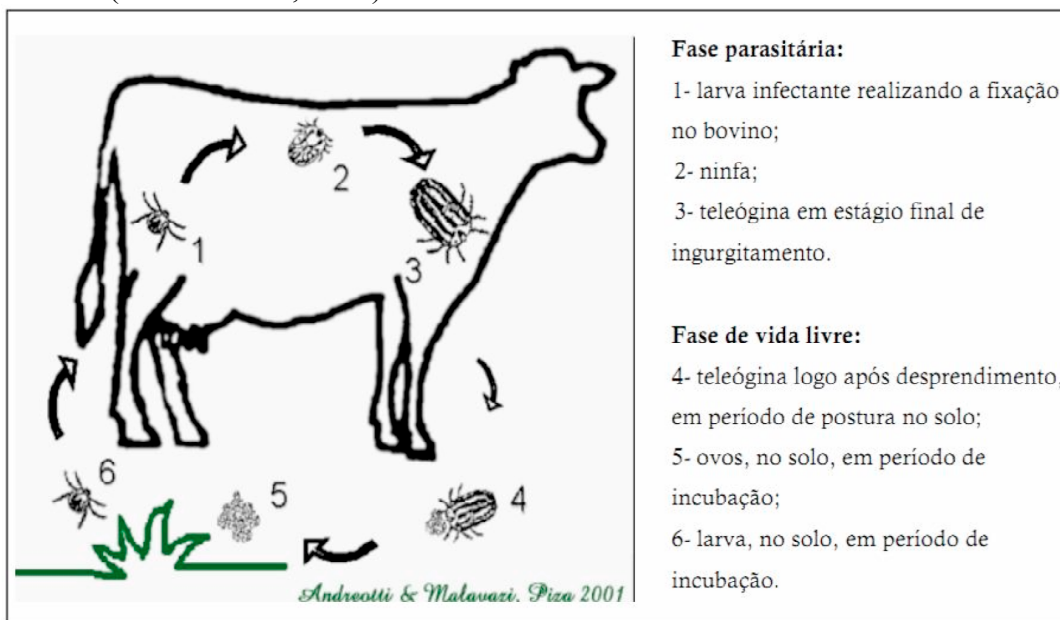
O *R. (B.) microplus* é parasito de um único hospedeiro (monoxeno) e apresenta o ciclo de vida dividido em duas fases: uma fase de vida livre, e uma fase parasitária (**Figura 2**).

A fase de vida livre tem duração de 20 dias a vários meses, dependendo das condições climáticas. Essa fase tem início quando a fêmea completamente ingurgitada (teleógina) se desprende do hospedeiro e cai ao solo. As teleóginas possuem geotropismo positivo e buscam abrigo protegido da luz solar no solo e na vegetação para dar início ao período de pré-postura que dura de dois a três dias, dependendo do volume de sangue ingerido (NAGAR, 1968) e da temperatura do ambiente (OLIVEIRA et al., 1974). Após esse período, tempo necessário para a formação dos ovos, as teleóginas realizam a postura durante cerca de 15 dias, podendo chegar a 3.000 ovos por fêmea, e morrem. Aproximadamente 18 dias após o término da postura, inicia-se a eclosão dos ovos, quando as condições são ideais para o desenvolvimento do embrião, ou seja, temperatura de aproximadamente 28°C e umidade relativa superior a 70% (GONZALES, 1995). Após um período de aproximadamente sete dias, as neolarvas transformam-se em larvas infectantes (CORDOVÉS, 1997) e migram por geotropismo negativo para as extremidades apicais da vegetação, onde localizam o hospedeiro pelo odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual e dióxido de carbono expirado (SONENSHINE, 1991). A fase de vida livre termina quando a larva encontra o hospedeiro, sendo que a fase de procura pelo hospedeiro pode variar significativamente, dependendo das condições ambientais principalmente baixas temperatura e umidade (ROCHA et al, 2006; DAVEY et al., 1991).

A fase de vida parasitária inicia-se com a fixação da larva infestante no hospedeiro, período que dura em média 18 a 26 dias no Brasil-Central (FURLONG, 1993). Assim que entram em contato com o bovino, as larvas migram para a região posterior das coxas e as

regiões perianal e perivulvar, que são mais propícias para o seu desenvolvimento em virtude da espessura, vascularização, temperatura da pele e dificuldade de auto-limpeza do hospedeiro (CORDOVÉS, 1996). As larvas passam a se alimentar e após sete dias, aproximadamente, sofrem a primeira ecdise, transformando-se em ninfas. Uma segunda ecdise ocorre oito dias depois dando origem aos adultos com dimorfismo sexual. Na fase adulta ocorre a cópula e as fêmeas passam a se alimentar de sangue até seu ingurgitamento total e queda ao solo (BENNETT, 1974 a; 1974 b). O acasalamento acontece a partir do 17º dia da infestação (LONDT; ARTHUR, 1975) com rápido ingurgitamento após a cópula, podendo as fêmeas aumentar em até 200 vezes seu peso (KEMP; STONE; BINNINGTON, 1982).

Os machos, por sua vez, permanecem no hospedeiro à procura de novas fêmeas, sobrevivendo até duas vezes mais do que essas (ROBERTS, 1968). Os carrapatos adultos machos recebem a denominação de neandros logo após a ecdise e de gonandros quando atingem o seu tamanho máximo. Já as fêmeas adultas são denominadas neóginas, logo após a ecdise, partenóginas, quando se encontram parcialmente ingurgitadas e teleóginas, quando estão ingurgitadas e prontas para se desprender do hospedeiro (GONZALES, 1995). É na fase de vida parasitária que o carrapato se alimenta, aumenta consideravelmente seu peso, armazena nutrientes para a fase seguinte no solo (quando fêmea), transmite agentes patogênicos ou não ao hospedeiro e determina os prejuízos econômicos decorrentes deste parasitismo (CORDOVÉS, 1996).



**Figura 2.** Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fase parasitária e fase de vida livre. Adaptado de ANDREOTTI e MALAVARI, 2001.

### 2.3 Importância Econômica

O Brasil é um dos países com maior rebanho de gado bovino comercial do mundo, cuja produtividade é determinante na economia do país. No entanto, devido às condições climáticas e deficiência no manejo, a infestação de rebanhos bovinos por *R. (B.) microplus* é fonte de grande preocupação na economia pecuária, produzindo perdas diretas e indiretas, como transmissão de agentes de doenças, ações espoliativas e pelo custo de seu controle. (ALMEIDA et al., 2006; JONSSON, 2006; BARROS et al., 2005; PENNA, 1990)

No Brasil, estima-se que 80% do rebanho bovino encontram-se infestados pelo *R. (B.) microplus*, o que leva a um prejuízo de cerca de dois bilhões de dólares anuais, devido à

diminuição do ganho de peso, conseqüentemente queda na produção de leite e carne, danos ao couro e também podem transmitir agentes patogênicos causadores da babesiose e anaplasmose podendo acarretar a morte do animal. Além dos elevados custos com o controle e contratação de mão-de-obra especializada (GRISI et al., 2002). Brito (2008) estima uma perda no Brasil na ordem de um bilhão de dólares anuais.

As infestações por *R. (B.) microplus* são conhecidas pelo seu efeito adverso na produtividade pecuária (JOSSON, 2006). Durante a fase parasitária, um único carrapato suga de dois a três mL de sangue (GONZALES, 1995; FURLONG, 1993), o que, dependendo da intensidade da infestação parasitária, se reflete em anemia, perdas na produção de leite e carne (SUTHERST et al., 1983; EVANS et al., 2000; JONSSON, 2006; JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Através de um estudo realizado na Austrália foi estimado que cada fêmea de *R. (B.) microplus* seria responsável pela queda de produção diária de aproximadamente 8,9 mL de leite e de 1,0 g de peso corporal (JONSSON et al., 1998).

Os danos ao couro causados pelas lesões e reações inflamatórias nos pontos da fixação do carrapato culminam na desvalorização no preço final do produto (SEIFERT et al., 1968; HORN; ARTECHE, 1985). Estas lesões também podem favorecer o aparecimento de infecções secundárias como as miíases cutâneas (GONZALES; SERRA-FREIRE, 1992).

Este artrópode é responsável pela transmissão de microrganismos que migram para a saliva, sendo inoculados durante o repasto sanguíneo, entre eles os agentes do complexo da tristeza parasitária bovina, com elevado grau de morbidade e mortalidade (ALMEIDA et al., 2006). Nenhum outro grupo de artrópodes vetores é capaz de transmitir uma variedade tão grande de patógenos, entre protozoários, bactérias e vírus (JONGEJAN; UILENBERG, 2004), dentre os quais estão os causadores de doenças, tais como, a babesiose (*Babesia bovis* e *Babesia bigemina*), a anaplasmose (*Anaplasma marginale*), a teleriose (*Theileria annulata*) e a doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*) (NARI et al., 1995; PETER et al., 2005; NUTTALL et al., 2006), cujas medidas de prevenção e ocorrência de surtos são de grande impacto sanitário e econômico na pecuária (YOUNG E MORZARIA, 1986). Em casos mais graves, a espoliação causada pelo carrapato pode até levar à morte do hospedeiro (GONZALES, 1995, HORN, 1983).

Além dos prejuízos diretos causados pela infestação de carrapatos, existem as despesas com instalações e equipamentos necessários à aplicação de acaricidas nos rebanhos, aquisição destes produtos e período de carência após aplicação das drogas. A existência de carrapatos e das enfermidades por eles transmitidas limita em muitos casos a exportação de bovinos vivos de certas regiões endêmicas para áreas livres de carrapatos (CORDOVÉS, 1996). Para a diminuição destes prejuízos torna-se necessário o controle do ectoparasito no rebanho.

## 2.4 Vacinas Contra Carrapatos

Outra medida profilática empregada no controle de infestações causadas por *R. (B.) microplus* é o uso de vacinas, sendo considerado um método promissor como alternativa ao uso de acaricidas (WILLADSEN e KEMP, 1988; WILLADSEN, 2004 e 2006). Ao longo dos últimos 20 anos alguns candidatos a vacinas foram desenvolvidos por vários grupos de pesquisa (DE LA FUENTE et al., 1988, WILLADSEN e KEMP, 1989, RODRIGUEZ et al., 1995, WILLADSEN; JONGEJAN, 1999, PATARROYO et al., 2002, DA SILVA VAZ JR et al., 2002).

O desenvolvimento de uma vacina depende da identificação de moléculas com potencial protetor para o parasito, caracterização de seus papéis na fisiologia do carrapato e produção de antígenos recombinantes, etapa fundamental para produção de uma vacina

economicamente viável (WILLADSEN, 2001; 2004).

Duas fontes de antígenos candidatos à vacina são identificáveis: os antígenos naturalmente expostos ao sistema imune do hospedeiro durante a fase parasitária, como proteínas e peptídeos sintetizados na glândula salivar; e os antígenos ocultos que não entram em contato com o hospedeiro (NUTTALL et al., 2006). Este novo conceito surgiu com experimentos de vacinação contra o *R. (B.) microplus* (WILLADSEN e KEMP, 1988). Por não entrarem em contato com o sistema imunológico do hospedeiro, os antígenos ocultos não tem possibilidade de induzir resposta imune durante o parasitismo. Entretanto, uma vez que o hospedeiro seja imunizado artificialmente com um destes antígenos, anticorpos e outros elementos do sistema imune, se ingeridos pelo parasito, interagem com a proteína utilizada na imunização, podendo interferir nas funções desta de modo a causarem danos ao parasito (DA SILVA VAZ JR et al., 2002).

A vantagem estratégica do uso de vacinas com antígenos ocultos é a de evitar os principais mecanismos que os parasitos apresentam para escapar da resposta imune do hospedeiro como inibidores do sistema complemento, da resposta inflamatória, da proliferação de linfócitos T, produção de citocinas e histamina (BARRIGA, 1999). No entanto, uma implicação negativa do uso de antígenos ocultos é que a resposta imunológica dos animais tratados não é continuamente estimulada pela infestação natural, necessitando de revacinação para manutenção da proteção (WILLADSEN, 2004). Preenchendo os requisitos deste conceito, o primeiro antígeno oculto isolado em carrapatos foi a proteína Bm86, uma glicoproteína de membrana presente no intestino (WILLADSEN, et al., 1989). A Bm86 induz resposta imunológica em bovinos imunizados sendo base de duas vacinas comerciais presentes no mercado: a TickGard™ (Biotech Australia Pty. Ltd., Austrália), desenvolvida na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO, e a Gavac™ (Heber Biotec S.A., Havana, Cuba) desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba. Infelizmente, a eficiência dessas vacinas não tem sido satisfatória, e mesmo com seu uso, ainda se faz necessário utilizar formas químicas de controle, além dos sucessivos reforços que devem ser administrados, o que dificulta o manejo da vacina (DE LA FUENTE et al., 2007). No Brasil, estima-se que houve uma redução entre 45% e 60% no percentual de infestação em bovinos imunizados com a Bm86 e submetidos à infestação natural com *R. (B.) microplus* (RODRIGUEZ et al., 1995).

Foi demonstrado que 2% dos anticorpos ingeridos por uma fêmea ingurgitada durante a refeição sanguínea em um hospedeiro vacinado estão viáveis na hemolinfa (DA SILVA VAZ JR. et al., 1996). Isto mostra que os anticorpos presentes no sangue do hospedeiro são capazes de atingir, via hemolinfa, órgãos internos do carrapato, podendo interferir em processos fisiológicos não exclusivamente relacionados à digestão. Este resultado suporta o estudo de proteínas de órgãos que não entram em contato com o hospedeiro.

A Pró cathepsina de ovos de *Boophilus* (*Boophilus* *yolk pro-cathepsin*, BYC) uma glicoproteína de 50 kDa purificada dos ovos do *R. (B.) microplus* foi capaz de induzir resposta imune protetora em bovinos contra infestações desse carrapato (LOGULLO et al., 1998). Os efeitos protetores foram observados pela redução no número de teleóginas, capacidade de postura e fertilidade dos ovos, com eficácia variando entre 14% e 36% (DA SILVA VAZ JR et al., 1998). A taxa de proteção induzida pela BYC nativa e pela BYC recombinante é insuficiente para permitir um controle eficiente do *R. (B.) microplus*. Uma possível razão para estes resultados se deve ao fato da BYC ser abundante nos ovos, necessitando alta concentração de anticorpos para induzir um dano significativo nos carrapatos. Dados que corroboram para essa suposição é a observação de que a inoculação de anticorpos monoclonais anti-BYC em fêmeas ingurgitadas de carrapato induzem redução de fertilidade de forma dose-dependente (DA SILVA VAZ JR et al., 1998).

Experimentos de imunização de bovinos com a cisteína endopeptidases envolvidas na degradação de vitelina (*Vitellin-degrading cysteine endopeptidase*, VTDC), demonstraram também a imunogenicidade dessa proteína. A produção de anticorpos específicos pelos animais aumentou gradualmente em resposta as imunizações com VTDC purificada de ovos. Análises por *western blot* confirmaram a presença de anticorpos anti-VTDC no soro dos animais imunizados. Estes foram desafiados com larvas de *R. (B.) microplus* e apresentaram um índice de proteção global de 21%, sendo também observada a redução de 18% no peso e na fertilidade dos ovos de fêmeas alimentadas nos bovinos imunizados com VTDC (SEIXAS et al., 2008).

Inibidores de tripsina foram detectados em diferentes fases de desenvolvimento do *R. (B.) microplus*, indicando um possível papel na interação parasito-hospedeiro. Esses inibidores foram usados como antígenos para a imunização de bovinos que foram desafiados com larvas de carrapato. Esses bovinos apresentaram redução de 68% no número total de carrapatos, 71% no peso total dos ovos e 69% no peso total das fêmeas ingurgitadas, quando comparados aos bovinos controles. A eficácia total da vacinação foi de 73% (ANDREOTTI et al., 2002).

O potencial imunogênico da vitelina (VT), principal proteína de reserva do ovo, foi avaliado em experimentos de imunização, usando bovinos como modelos experimentais. Foram avaliadas duas glicoproteínas derivadas do complexo vitelina, uma de 87 kDa (VIT87) e outra de 80 kDa (GP80), purificadas a partir de ovos e larvas, respectivamente. A eficácia global da imunização, mensurada pela redução no número de larvas após um ciclo completo, foi de 68% com VIT87 e 66% com GP80 (TELLAM et al., 2002).

Além dos antígenos aqui citados, muitos outros têm sido testados, no entanto, nenhum apresentou eficácia para garantir a produção de uma vacina mais eficiente contra carrapatos (DE LA FUENTE et al., 2007) e assim, ainda hoje a pesquisa de antígenos com potencial protetor constitui o maior desafio para o desenvolvimento de vacinas, sendo o objeto de pesquisa de vários grupos (GUERRERO et al., 2006; KOCAN et al., 2007; LEAL et al., 2006 b; LIMA et al., 2006; PECONICK et al., 2008; WILLADSEN, 2008; DA SILVA VAZ JR. et al., 1998). Deste modo, o estudo mais detalhado da fisiologia e da bioquímica do carrapato, como o estudo dos processos envolvidos resposta imune inata, constitui uma estratégia interessante para a identificação de novas proteínas que possam servir de alvo para novos métodos de controle do parasito.

Porém, apesar de todos os esforços empregados, ainda não foi encontrada uma molécula capaz de conferir imunidade com eficácia aos bovinos contra o *R. (B.) microplus* e, conseqüentemente, evitar a infecção por patógenos por ele transmitidos.

## 2.5 Controle Químico

A busca por produtos eficazes para o controle do carrapato dos bovinos *R. (B.) microplus* ocorre desde o final do século XIX. Até meados do século XX, os acaricidas mais utilizados no controle de carrapatos eram os derivados arsenicais, os quais tinham baixa eficácia e, além disso, deixavam resíduos altamente tóxicos para os bovinos (GRAF et al., 2004).

Com o passar dos anos, várias classes de acaricidas foram produzidas, entre elas os organofosforados e organoclorados (FREIRE, 1953; FREIRE, 1956). Nos anos setenta, iniciou-se o uso das formamidinas e, nos anos oitenta, foram lançados os piretróides. Após este período, vieram as lactonas macrocíclicas, os fenilpirazóis, as benzoilfeniluréias e as espinosinas (KLAFKE, 2006). Entretanto, o uso errôneo destes acaricidas, tem resultado no acúmulo de resíduos tóxicos na carne e no leite, poluição do meio ambiente, intoxicação dos

seres humanos, altos custos para produção, além da seleção de carrapatos resistentes (DE LA FUENTE et al., 1999; BEUGNET; CHARDONNET, 1995; JONSSON, 1997; LATIF; LONGEJAN, 2002).

Desde a década de quarenta, a aplicação desses produtos químicos vem sendo utilizada de forma constante, o que favoreceu a seleção de populações resistentes. No Brasil, a resistência dos carrapatos aos acaricidas está amplamente difundida (OLIVEIRA et al., 2000; MENDES et al., 2001; MENDES, 2005). Além disso, é crescente o número de relatos que apontam um aumento das populações de carrapatos resistentes a diversos princípios químicos presentes nos acaricidas, reduzindo a eficiência do controle (BARRÉ et al., 2008; JONSSON; HOPE, 2007; LI et al., 2004; MARTINS; FURLONG, 2001).

A resistência do carrapato aos agentes químicos, após seu uso contínuo, é consequência de alterações no sítio de ação destes agentes e do desenvolvimento de mecanismos adaptativos resultantes de mutações em alguns indivíduos da população (FURLONG et al., 2004; FREITAS et al., 2005). Furlong e Martins (2000) descreveram o processo como estabelecimento do alelo resistente, onde o uso contínuo do produto leva ao aumento de indivíduos com a característica de resistência, propagando o alelo resistente por pressão de seleção. A proporção dos genes resistentes na população aumenta de acordo com a proporção dos parasitos resistentes (SANGSTER, 2001).

Devido à seleção de populações resistentes a determinados princípios ativos, há a necessidade de utilizar acaricidas com diferentes composições, e o uso destes acaricidas muitas vezes em um curto período de tempo acaba por selecionar novas populações resistentes a mais de um princípio ativo, caracterizando um ciclo vicioso (FREITAS et al., 2005). Então medidas de controles alternativos são foco de pesquisadores visando a diminuição do uso de acaricidas químicos.

## **2.6 Controle Microbiano**

O controle microbiano pode ser definido sucintamente como a intervenção humana no comportamento natural de microrganismos, para controlar e/ou combater as chamadas pragas parasitárias, observadas tanto na agricultura quanto em medicina veterinária.

O controle microbiano possui atributos favoráveis que possibilitam seu uso como medida estratégica para controle de pragas. Esses fatores são a alta patogenicidade apresentada por alguns microrganismos, a capacidade de multiplicação, dispersão no ambiente, o caráter enzoótico e a não toxicidade a mamíferos. Atualmente, é crescente o número de trabalhos publicados por pesquisadores na área de controle microbiano de carrapatos envolvendo fungos (BITTENCOURT et al., 2003), vírus, bactérias, protozoários e nematóides (SAMISH; REHACED, 1999; SAMISH et al., 2004).

Segundo Bahiense et al. (2006), o controle biológico é uma opção promissora para a manutenção de níveis aceitáveis das populações de carrapatos no rebanho bovino. Outra grande vantagem, é que o controle biológico possibilita a associação de microrganismos a formulações medicamentosas, diminuindo os resíduos ou toxicidade para animais e o ambiente. Além disso, há diminuição da possibilidade de aparecimento de resistência, pois os microrganismos utilizam diversos mecanismos para parasitar seus hospedeiros (ALVES, 1998).

Os fungos entomopatogênicos são os agentes microbianos mais promissores como método alternativo ao controle químico dos carrapatos, isso se deve à capacidade destes organismos em penetrar diretamente pela cutícula do artrópode. Dessa forma, não necessita ser ingerido pelo hospedeiro para iniciar a infecção (ALVES, 1998; SAMISH et al., 2004; THOMAS; READ, 2007). Na maioria dos casos os fungos são capazes de infectar todos os

estágios de desenvolvimento do carrapato. A grande variabilidade genética apresentada pelos fungos entomopatogênicos através de técnicas apropriadas possibilita a seleção de isolados fúngicos altamente virulentos, mais específicos e tolerantes às condições climáticas para serem utilizados como inseticidas microbianos (ALVES, 1998).

### 2.6.1 Fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos foram os primeiros patógenos a serem utilizados no controle microbiano. A maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos ocorre no Brasil, e em condições naturais, tanto enzoótica quanto epizootica, sua ocorrência é um fator importante na redução das populações de pragas. A grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma de suas principais vantagens no controle microbiano de artrópodes, pois o uso da ferramenta da biologia molecular permite selecionar isolados altamente virulentos, específicos ou não, para o controle de um grande número de pragas com relativa segurança ambiental (ALVES, 1998; THOMAS; READ, 2007). A compatibilidade dos fungos com produtos químicos visando a ação sinérgica e consequentemente um controle mais rápido e eficaz tem sido investigada para o controle de *R. (B.) microplus* (BAHIENSE et al., 2008).

O controle biológico de carrapatos utilizando fungos entomopatogênicos tem apresentado resultados potencialmente satisfatórios. Dentre os fungos estudados, um está sendo considerado agente promissor no controle microbiológico de carrapatos, o fungo *Beauveria bassiana* (BARCI et al., 2009, BITTENCOURT et al. 1996; 2002). Em pesquisa realizada com isolados de *B. bassiana*, foi verificada a compatibilidade de dois isolados mais virulentos desse fungo com o uso do acaricida químico amitraz (POSADAS; LECUONA, 2009).

Esta espécie possui ampla distribuição geográfica (ALVES, 1998) e representa a espécie mais estudada no controle biológico de carrapatos (LIPA, 1971; ROBERTS; HUMBER, 1981; ALVES, 1998) apresentando resultados mais satisfatórios em condições laboratoriais, demonstrando-se patogênicos para várias espécies de carrapatos, como *Amblyomma cooperi*, (REIS et al., 2003), *Amblyomma cajennense* (REIS et al., 2004), *Amblyomma variegatum* (MARANGA et al., 2005), *Rhipicephalus sanguineus* (GARCIA et al., 2004; GARCIA et al., 2005; PRETTE et al., 2005) e *R. (B.) microplus* (BITTENCOURT et al., 1992; MONTEIRO et al., 1998).

No entanto, sua aplicabilidade está restrita a testes *in vitro* e diretamente no hospedeiro (BITTENCOURT et al., 1994a). A maioria dos testes que foram realizados a campo com fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos na América do Sul demonstrou baixa eficácia (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008), com exceção de uma formulação de gel de celulose polimerizada e conídios de *B. bassiana* aplicada diretamente nas orelhas dos equinos para reduzir a infestação de *Anocentor nitens* (SOUZA et al., 2009).

Provavelmente, a baixa eficiência dos fungos em testes de campo está relacionada a fatores bióticos e abióticos que podem influenciar na sua sobrevivência, propagação e infecção do hospedeiro (GOETTEL et al., 2000). Uma das desvantagens da utilização destes agentes de controle microbiano é a sua susceptibilidade aos fatores ambientais como calor e radiação ultravioleta (RANGEL et al., 2004; CAGAN; SVERCEL, 2001). No entanto, a seleção de isolados mais tolerantes e o desenvolvimento de formulações fúngicas podem aumentar a viabilidade dos conídios, permitindo sua utilização a campo (FARGUES et al., 1996). A utilização *in vitro* de formulação de fungos entomopatogênicos mostrou ser um importante fator no aumento da eficiência dos isolados fúngicos no controle de carrapatos (LOPES et al., 2007; ANGELO et al., 2010).

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

Cerca de 750 espécies de fungos agrupados em 56 gêneros são conhecidos por serem patógenos ou parasitos de artrópodes (HAWKSWORTH et al., 1995) e aproximadamente 170 produtos, oriundos de cerca de 13 espécies de fungos, têm sido formulados e registrados como micoinseticidas ou micoacaricidas em programas de controle biológico contra várias espécies de pragas (DE FARIA; WRAIGHT, 2007). A maioria dos fungos patogênicos de artrópodes estudados mundialmente pertence a quatro gêneros: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* (= *Verticillium*) e *Isaria* (= *Paecilomyces*) (CHANDLER et al., 2000; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

A busca de novos fungos e utilização dos mesmos no controle biológico de carrapatos se deve aos resultados promissores encontrados em testes *in vitro*. Por isso, a pesquisa nesta área vem sendo bastante explorada e o número de trabalhos é cada vez maior. O que tem se buscado é estabelecer estratégias racionais e eficazes para possibilitar uma forma de manejo integrada para controle de artrópodes (CHANDLER et al., 2000), que irão contribuir para melhorias na produção animal e para minimizar os danos ecológicos (ATHAYDE et al., 2001).

#### **2.6.1.1 *Beauveria bassiana***

A primeira descrição de *B. bassiana* foi em 1835 por Balsamo com o nome de *Botrytis bassiana*, porém o gênero *Bassiana* foi reorganizado em 1912 (LIMA, 1989). As espécies de *Beauveria ssp.* são classificadas como fungos Deuteromicetos, classe Hifomicetos assexuados, por se reproduzirem através da produção de conídios. Porém, com o advento da biologia molecular, essas espécies foram agrupadas como fungos sexuados (REHNER, 2005).

O gênero *Beauveria* inclui espécies de fungos com grande potencial como agente de controle microbiano. A espécie *B. bassiana* é de ocorrência cosmopolita, sendo frequentemente encontrada sobre artrópodes e amostra de solos (ALVES, 1998).

A germinação dos conídios de *B. bassiana* ocorre, geralmente, em um período de 12 horas após a inoculação. A fase de penetração do fungo, geralmente pelo tegumento, ocorre em função de uma ação mecânica e efeitos enzimáticos, com duração de aproximadamente 12 horas. Após 72 horas da inoculação, o carrapato apresenta-se colonizado com uma grande quantidade de conidióforos e conídios. Entretanto, para aumentar a capacidade de disseminação dos propágulos, são necessárias algumas condições favoráveis, destacando-se a temperatura, umidade relativa e radiação (ALVES, 1998).

Para que ocorra germinação dos conídios, crescimento vegetativo e esporulação de *B. bassiana* é ideal que a temperatura esteja na faixa entre 23 a 28°C, porém este fungo pode suportar temperaturas de até 45°C (ALVES; LECUONA, 1998). Portanto, a temperatura ambiental pode influenciar na utilização de fungos como agentes para o biocontrole, porém, o fator abiótico mais importante é a radiação solar, particularmente a ultra-violeta-B, que possui a maior capacidade de impossibilitar a ação do fungo. Fernandes (2007), em seu estudo de caracterização e seleção de 60 isolados de *Beauveria ssp.* para o controle microbiano do carrapato *R. (B.) microplus*, observou que alguns isolados, cujos conídios foram expostos a duas horas de radiação ultra violeta apresentaram diminuições significativas dos percentuais de germinação, influenciando diretamente na virulência destes microrganismos.

O primeiro relato de *B. bassiana* em carrapatos foi sobre a espécie *Ixodes ricinus*,



quando fêmeas ingurgitadas foram coletadas em campo e mantidas em laboratório sob observação, sendo verificada a presença de hifas na abertura oral do carrapato após a morte, porém não houve alterações na postura (SAMSINAKOVA, 1957).

Bittencourt et al. (1996) evidenciaram elevada capacidade carrapaticida dos isolados 986 e 747 de *B. bassiana* quando verificaram sua patogenicidade *in vitro* sobre ovos e larvas não alimentadas de *R. (B.) microplus*, observando uma elevada redução do percentual de eclosão e uma maior mortalidade das larvas nos grupos tratados.

Desde então, a patogenicidade deste fungo vem sendo amplamente estudada e tem apresentado resultados satisfatórios sobre várias espécies de carrapatos, entre elas *R. (B.) microplus*, *R. sanguineus*, *A. nitens*, *A. cajennesne* (BITTENCOURT et al., 1995; MONTEIRO, 1997; SOUZA, 1999; BITTENCOURT et al., 2002; MONTEIRO et al., 2003; REIS et al., 2004).

## 2.7 Sistema Imune de Artrópodes

Os seres vivos estão constantemente em contato com microrganismos potencialmente patogênicos como vírus, fungos, bactéria, protozoários e helmintos. E para conter o estabelecimento de uma infecção, contam com uma resposta imune eficiente. O sistema imune dos artrópodes, apesar de só contar com a resposta inata, sendo, menos complexo que o dos vertebrados, é muito eficiente em combater uma vasta gama de microrganismos invasores. Para tanto, estes organismos continuamente desenvolvem mecanismos de defesa celular e humoral contra estes invasores (RATCLIFFE; WHITTEN, 2004). Apesar de não possuírem células de memória, anticorpos e linfócitos iguais aos dos vertebrados (BULET et al., 2004), estes organismos apresentam mecanismos de memória imunológica inata (RODRIGUES et al., 2010), moléculas semelhantes a anticorpos (DONG et al., 2006) e células similares aos linfócitos chamadas de hemócitos. Populações naturais de artrópodes apresentam diferentes graus de susceptibilidade a organismos invasores (COLLINS et al., 2002; HUME et al., 2007).

A primeira linha de defesa dos artrópodes é constituída por barreiras estruturais (exoesqueleto rígido de quitina e o revestimento quitinoso das traquéias) que dificultam o contato do patógeno com o organismo. Quando agentes patogênicos conseguem transpor as barreiras iniciais e atingir o interior do corpo dos invertebrados uma série de reações é iniciada no organismo, que podem ser classificadas em celulares e humorais com o objetivo de eliminar o microrganismo invasor (DUNN, 1986; GILLESPIE et al., 1997; OMOTO; ALVES, 1998; LAVINE; STRAND, 2002; LEVASHINA, 2004).

As principais células e órgãos que participam da resposta imune dos artrópodes são o corpo gorduroso, as células epiteliais e os hemócitos. Os hemócitos são células circulantes na hemolinfa que possuem papel determinante no combate sistêmico a infecções (HILLYER et al., 2009). A hematopoiese, que ocorre nas glândulas linfáticas, é responsável por produzir os progenitores dos hemócitos, chamados de pró-hemócitos. A classificação dos hemócitos é bastante complexa, uma vez que a maioria dos autores baseou-se em observações morfológicas para sua classificação.

Os hemócitos são os principais componentes da hemolinfa do carrapato, constituindo cerca de 50% a 60% de seu conteúdo (SONENSHINE, 1991). Estimativas do número de hemócitos na hemolinfa de carrapatos variam de 5.000 a 73.000/mm<sup>3</sup> (WOOLLEY, 1988). De acordo com o sistema proposto por Binnington e Obenchain (1982), os carrapatos possuem 5 classes de hemócitos, conhecidas como pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos (tipo I e II), esferulócitos e oenocitóides, sendo os quatro primeiros os tipos celulares mais encontrados na hemolinfa. Zhioua et al. (1996) relataram que os hemócitos têm um papel

dominante na resposta imune do carrapato, como por exemplo, funções fagocítica e secretória, liberando peptídeos antimicrobianos - PAM (FOGAÇA et al., 2006) e espécies reativas de oxigênio - ERO (PEREIRA et al., 2001), os plasmatócitos são responsáveis pela fagocitose (KUHN; HAUG, 1994) e os granulócitos pelo encapsulamento de organismos maiores (EGGENBERGER et al., 1990).

Em carrapatos, o corpo gorduroso é um órgão difuso, consistindo de muitos cordões de células ligados aos ramos do sistema traqueal e ocasionalmente a outros órgãos, contrastando com o de outros artrópodes, onde se concentra na região abdominal. As células do corpo gorduroso são abundantes ao redor dos troncos traqueais, especialmente próximos da sua origem com os espiráculos respiratórios (SONENSHINE, 1991).

Segundo Obenchain e Oliver (1973) o corpo gorduroso é dividido em duas regiões: central, ao redor do sistema reprodutivo e outros órgãos internos; e região periférica, ao redor dos troncos traqueais, traquéia, tecido conectivo e disperso entre a epiderme. No entanto, Denardi et al. (2008) sugeriram outra terminologia para descrever a localização deste tecido: corpo gorduroso parietal, substituindo o termo periférico e perivisceral, substituindo o termo central. Essa diferenciação regional determina diferentes funções, uma vez que o corpo gorduroso periférico apresenta indícios de grânulos de glicogênio, indicativo de papel de armazenamento, enquanto o central mostra evidências de atividade biosintética (KEELEY, 1985). No entanto, o corpo gorduroso em fêmeas de carrapatos é altamente ativo após a alimentação e fecundação (SONENSHINE, 1991).

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

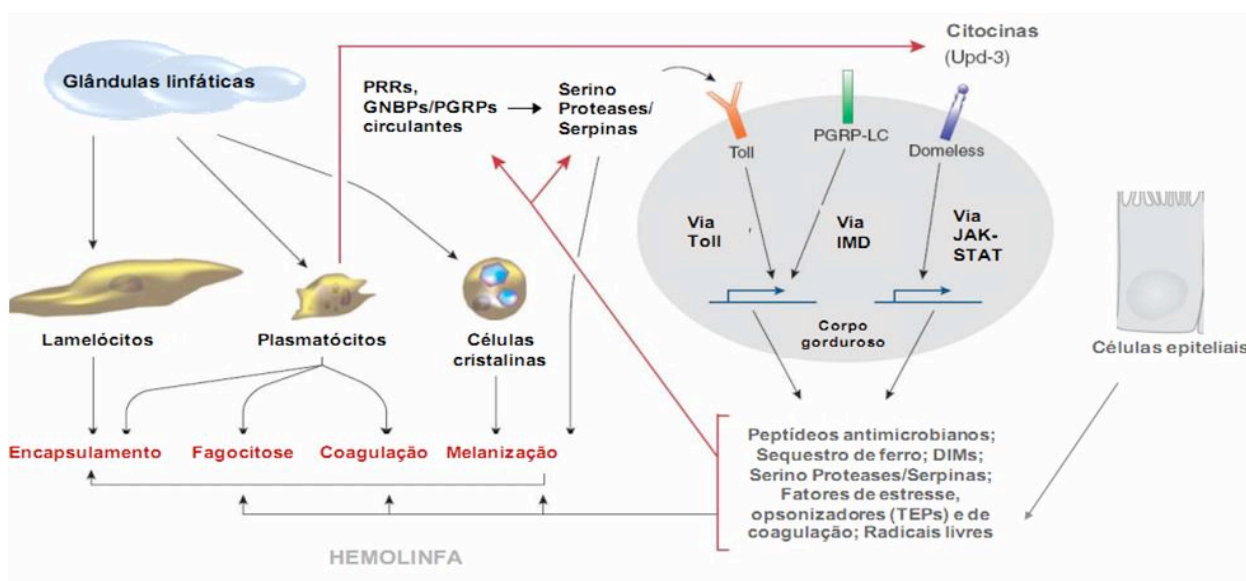
Este órgão constitui uma porcentagem considerável do peso dos artrópodes (mais de 50% em alguns casos) é derivado do mesoderma somático durante a embriogênese. Devido ao seu grande tamanho e sua localização na hemocele do inseto, o corpo gorduroso é o principal tecido relacionado à imunidade, pois é responsável pela síntese e secreção de peptídeos na hemolinfa, onde esses atingem concentrações eficazes (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; GILBERT; CHINO, 1974; STEELE, 1985; BEENAKKERS et al. 1984).

Tsvileneva (1961; 1963), estudando o corpo gorduroso em outras espécies de carrapatos observou dois tipos de células, diferenciadas umas das outras pela basofilia de seu citoplasma. As acidófilas foram consideradas equivalentes aos trofócitos e as basófilas aos nefrócitos dos artrópodes. Ainda segundo Tsvileneva (1961; 1965) e Balashov (1963) as células denominadas de nefrócitos nos carrapatos, provavelmente seriam análogas aos enócitos dos artrópodes. Entretanto, Denardi et al. (2008) mostrou que em corpo gorduroso de carrapatos *A. cajennense* não existem nefrócitos, nem células semelhantes aos enócitos dos artrópodes, e sim, apenas trofócitos.

Denardi et al. (2008) através de estudo morfométrico mostrou que o corpo gorduroso de *A. cajennense* é constituído por dois tipos de trofócitos, denominados de trofócito cúbico (trC) e trofócito arredondado (trR) devido às suas formas e histologia, sendo ambos os tipos encontrados tanto no corpo gorduroso parietal quanto no perivisceral. As análises morfométricas destas células de *A. cajennense* mostraram que os trofócitos cúbicos possuem área citoplasmática significativamente inferior àquela dos arredondados. Uma provável explicação para este fato seria de que os trofócitos cúbicos estariam sofrendo pressão das células adjacentes (outros trofócitos), uma vez que, estariam arrançados na forma de cordões.

Já os arredondados, os quais se encontram isolados e localizados em cima dos cordões de trofócitos cúbicos, não estariam sujeitos a este tipo de pressão e, além disso, teriam conseqüentemente uma maior área de contato com a hemolinfa.

Organismos invasores são reconhecidos pelos artrópodes através de receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors* - PRR) que reconhecem os padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns* - PAMP). Após o reconhecimento dos patógenos pelos PRR, algumas reações do sistema imune podem ser desencadeadas: (1) resposta humoral com produção de moléculas efetoras como, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e peptídeos antimicrobianos (PAM); (2) resposta celular que resulta na fagocitose, encapsulamento e indução de apoptose; e (3) reação de profenoloxidasas que depositam melanina em volta dos microrganismos (**Figura 3**) (HULTMARK, 2003; NAPPI; OTTAVIANI, 2000; BULET et al., 2004; IWANAGA; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; MULLER et al., 2008; MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009).



**Figura 3.** Resumo esquemático do sistema de defesa de artrópodes. A detecção do patógeno leva a produção de um grande espectro de moléculas de defesa em tecidos que respondem imunologicamente (modificado de LEMAITRE e HOFFMANN, 2007).

Muito do nosso conhecimento atual sobre o sistema imunológico de invertebrados foi moldado por estudos em *D. melanogaster* (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007) e por dados obtidos de poucas espécies de lepidópteros, tais como *Manduca sexta* (KANOST et al., 2004). Carrapatos possuem um sistema imune capaz de lhes conferir proteção contra agentes invasores, assim como outros artrópodes. Porém comparativamente aos mamíferos, pouco se conhece do sistema imune de artrópodes como o carrapato (SONENSHINE; HYNES, 2008).

### 2.7.1 Mecanismos de defesa celular

As reações celulares ou imunidade celular são executadas pelos hemócitos e compreendem fagocitose, nodulação e encapsulamento, além da ativação da cascata de enzimas que regulam a melanização e a coagulação da hemolinfa (IWANAGA; LEE, 2005; MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009).

Os processos de nodulação e encapsulamento ocorrem pela deposição de hemócitos sobre o agente invasor formando uma matriz celular com posterior melanização no seu interior para a destruição do agente retido (TANADA; KAYA, 1993; LAVINE; STRAND, 2002). Segundo Silva et al. (2000) este processo ocorre posteriormente à fagocitose quando esta não for suficiente para combater a infecção.

A fagocitose é o processo de defesa celular baseado no reconhecimento, englobamento e destruição intracelular dos patógenos invasores pelos hemócitos. É mediada por PRR que se ligam à PAMP e desencadeiam uma cascata de sinalização que leva à internalização do invasor através de um mecanismo dependente de actina (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).

A hemolinfa dos carrapatos desempenha importante papel na resposta imune celular desses animais, principalmente pelo processo de fagocitose que é realizado pelos hemócitos, células circulantes da hemolinfa. No carrapato *R. (B.) microplus* foram identificadas duas populações de hemócitos, os granulócitos e os plasmatócitos, sendo que após o desafio com leveduras, foi observado o processo de fagocitose sendo realizado pelos plasmatócitos (PEREIRA *et al.*, 2001). Na hemolinfa do carrapato *Ornithodoros moubata*, foram identificadas três populações de hemócitos: os pró-hemócitos, os granulócitos e os plasmatócitos, sendo os dois últimos responsáveis pela fagocitose (IONUE *et al.*, 2001).

Na maioria dos artrópodes, os plasmatócitos e os granulócitos são as principais células fagocíticas, que ao receberem sinais da presença de bactérias ou outro microrganismo, migram rapidamente para o local da infecção e, eventualmente, fagocitam e destroem os invasores (SILVA *et al.*, 2000; LAMPROU *et al.*, 2007). A fagocitose tem sido observada em várias espécies de carrapatos e parece ser uma das defesas primárias contra a invasão de microrganismos (ZHIOUA *et al.*, 1997).

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

Quando o agente estranho não pode ser fagocitado ou isolado em nódulos, os artrópodes se defendem formando cápsulas (STRAND; PECH, 1995). O encapsulamento refere-se à ligação dos hemócitos aos invasores maiores, protozoários e nematóides, formando uma cápsula com multicamadas ao redor do invasor, que em última instância, é acompanhada pela melanização. Dentro da cápsula, o patógeno é morto possivelmente pela produção local de produtos citotóxicos como espécies reativas de oxigênio e intermediários da cascata de melanização (NAPPI; OTTAVIANI, 2000), porém a exata causa da morte ainda não é conhecida (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).

A melanização é uma reação imune, somente encontrada em artrópodes, que envolve a síntese de melanina e sua deposição em volta do patógeno. Neste grupo de organismos, é o tipo mais rápido de resposta imune, desencadeada poucos minutos após o desafio. A produção de melanina é promovida após o reconhecimento de patógenos, ativando de cascatas de serino proteases que clivam a forma inativa da pro-fenoloxidase para a forma ativa fenoloxidase (ASHIDA; BREY, 1998; CERENIUS; SODERHALL, 2004). As fenoloxidases catalisam a conversão de dopamina em melanina. As quinonas e os ERO gerados durante a melanização são tóxicos para os parasitos (CHRISTENSEN *et al.*, 2005). A reação de melanização interage com outras repostas imunes, como, fagocitose, produção de PAM e cicatrização (CERENIUS *et al.*, 2008). A reação de melanização precisa ser finamente regulada, caso contrário, produtos intermediários tóxicos são produzidos. As serpinas desempenham papel importante na regulação da reação de melanização através da inibição de serino proteases. A melanização

foi observada em vários artrópodes desafiados com plasmódios, bactérias e helmintos (CHRISTENSEN et al., 2005).

O mecanismo de coagulação da hemolinfa é ativado por uma cascata de serino-proteases, semelhantes às do sistema profenoloxidase, porém esta reação é independente da melanização (SCHERFER et al., 2004). Dois genes relacionados a fatores de coagulação, um fibrinogênio e uma anexina, são altamente expressos após lesão séptica em *Drosophila* (DE GREGORIO et al., 2001).

## 2.7.2 Mecanismos de defesa humoral

A resposta imune humoral dos artrópodes ocorre em quatro etapas principais segundo Michel e Kafatos (2005): (1) reconhecimento de PAMP por PRR, (2) modulação, levando à amplificação e disseminação do sinal de reconhecimento inicial; (3) produção de um conjunto de moléculas efetoras e ativação de cascatas de coagulação; e (4) aumento de moléculas de imunidade através da ativação de vias de transdução de sinal como Toll, Imunodeficiência (*Immune Deficiency*, IMD) e Janus quinase-tradutor de sinal e ativador de transcrição (*Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription*, JAK-STAT) (BULET; STOCKLIN, 2005; MICHAEL; KAFATOS, 2005; CHISTOPHIDES et al., 2002).

São exemplos de PAMP os componentes das paredes e membranas celulares dos patógenos, como peptidoglicanos (PGN), lipopolissacarídeos (LPS) e  $\beta$ -1,3 glucanos que são reconhecidos por PRR nos hemócitos, nos corpos gordurosos ou no plasma dos artrópodes (LAVINE; STRAND, 2002). Alguns PRR estudados em artrópodes são as proteínas que reconhecem peptidoglicanos (*Peptidoglycan recognition proteins* - PGRP) e proteínas que se ligam a bactéria gram-negativa (*Gram-negative bacterial-binding proteins* – GNBP), (OSTA et al., 2004). O reconhecimento destas moléculas exclusivas de patógenos é importante na montagem de uma resposta imune eficiente e direcionada ao invasor.

A ligação entre PAMP e PRR, responsável pelo reconhecimento de moléculas não próprias, ativa cascatas proteolíticas de serino proteases que amplificam o sinal e acionam a resposta efetora. Serino proteases com domínios clip (CLIP) são componentes essenciais dessas cascatas, pois ativam vias de sinalização que levam à síntese de PAM, aglutinação da hemolinfa e melanização (OSTA et al., 2004; MICHAEL; KAFATOS, 2005). Estas cascatas são finamente reguladas por serpinas, moléculas que inibem as serino proteases através de uma ligação covalente com o centro ativo da enzima (OSTA et al., 2004; REICHHART et al., 2005). Em artrópodes, atuam na regulação das vias Toll e das profenoloxidases, na coagulação da hemolinfa e na proteção contra proteinases de microrganismos.

Várias moléculas efetoras são produzidas após desafio dos artrópodes com microrganismos, como por exemplo: PAM, espécies reativas de oxigênio, proteínas com domínio do tipo fibrinogênio (FBN) (*fibrinogen-related proteins* - FREP), proteínas responsivas a bactérias (*Bacteria responsive proteins* - BRP), proteínas contendo domínios ricos em leucina (*Leucine rich-repeat (LRR) domain - containing proteins*) e lectinas do tipo C (*C-type lectins* – CTL).

### 2.7.2.1 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAM) são moléculas que fazem parte da imunidade inata e possuem um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e parasitos. Os PAM são as proteínas efetoras mais bem caracterizadas. São moléculas pequenas, de até 10kDa (com exceção da attacina de 25kDa), convencionalmente descritas como catiônicas, anfipáticas e que exibem alto teor de aminoácidos básicos e pelo menos 50% de aminoácidos

hidrofóbicos. As cargas positivas dos peptídeos facilitam sua interação com as cargas negativas dos fosfolípidos da membrana dos microrganismos invasores e, o caráter hidrofóbico, facilita sua inserção na membrana, promovendo a lise dos mesmos (BULET et al., 2004).

Em artrópodes, peptídeos com ação antimicrobiana são sintetizados principalmente em corpo gorduroso, hemócitos são fortemente induzidos após uma lesão e/ou infecção (BULET et al., 1999), e por estruturas que representam barreiras físicas como intestino médio, túbulos de Malpighi, traquéia e glândula salivar, e sendo secretados para a hemolinfa (LEVASHINA, 2004; HANCOCK et al., 2006; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).

O modo de atuação dos PAM de modo geral envolve a permeabilização da membrana plasmática dos microrganismos, embora possam atuar também sobre alvos intracelulares, inibindo a atividade de enzimas, impedindo a síntese de DNA, de RNA e de proteínas, ou ainda alterando a divisão celular e são muito estáveis, podendo permanecer na hemolinfa do inseto semanas após o desafio. (GOUMON et al., 1996; BROGDEN, 2005; YOUNT et al., 2006).

Os vinte PAM já descritos podem ser divididos em sete classes: defensinas, cecropinas, drosomicina, metchnikowina, atacina, dipterocina e drosocina. Em *R. (B.) microplus* já foram caracterizados três peptídeos antimicrobianos:

Microplusina: com massa molecular de 10.204Da e seis resíduos de cisteína, foi purificado da hemolinfa livre de células (FOGACA et al., 2004) e de ovos (ESTEVEES et al., 2009). A microplusina apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos (SILVA et al., 2009), e é expressa na forma de pré-peptídeo com um peptídeo sinal composto por 20 aminoácidos (FOGACA et al., 2004). Sua expressão foi demonstrada no corpo gorduroso, hemócitos, ovários, e também ovos. A localização deste peptídeo em diversas regiões do sistema reprodutivo feminino (como tubo conectivo e ovários), assim como nos ovos, sugere uma participação importante no mecanismo de defesa dos ovos e embriões em desenvolvimento (ESTEVEES et al., 2009).

Defensina (FOGACA et al., 2004): com massa molecular de 4.285Da e seis resíduos de cisteína, foi isolado dos hemócitos e apresenta similaridade com defensinas de outros invertebrados. A análise de sua sequência genética codificante demonstrou que este peptídeo antimicrobiano é expresso na forma de pré-pró-peptídeo assim como as defensinas de outros artrópodes. Sua expressão gênica é pronunciada no corpo gorduroso e nos hemócitos, além de também ser observada nos ovários.

Ixodidina (FOGACA et al., 2006): com massa molecular de 7.103Da e dez resíduos de cisteína, foi isolado dos hemócitos. Este peptídeo antimicrobiano é capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*. Sua estrutura primária não apresenta nenhuma similaridade com outros PAM descritos, porém é similar a inibidores de serina-proteases e se mostrou capaz de inibir a atividade hidrolítica de quimotripsina e de elastase.

A existência de diversos peptídeos antimicrobianos localizados em diferentes órgãos do carrapato *R. (B.) microplus* sugere a importância destes no controle de microrganismos invasores, agindo de forma local ou sistêmica. Portanto, os peptídeos antimicrobianos são importantes não somente como componentes do sistema imune inato de invertebrados participando do combate às infecções, mas seus análogos químicos ou recombinantes apresentam grande potencial para serem aplicados como antibióticos no combate a microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais (HANCOCK; SCOTT, 2000).

### 2.7.3 Regulação do sistema imune

Pesquisadores têm procurado correlacionar a ativação das vias de sinalização

imunológicas com a eficácia da resposta imune de mosquitos contra patógenos (MOLINA-CRUZ et al., 2008; GUPTA et al., 2005, GARVER et al., 2009, SOUZA-NETO et al., 2009). Dada sua relevância nos processos imunológicos, algumas vias de sinalização são altamente conservadas evolutivamente. Todas as proteínas efetoras produzidas após um desafio são reguladas primariamente ao nível transcricional, através de moléculas (fatores de transcrição – FT) que se ligam a regiões regulatórias dos genes efetores e promovem o aumento ou a diminuição da sua transcrição.

Muitos genes efetores como os PAM possuem em suas regiões regulatórias sítios de ligação a fatores de transcrição da família NF- $\kappa$ B. Estudos recentes tem demonstrado o papel destas moléculas na regulação dos PAM através de duas vias de sinalização distintas, Toll e IMD (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). A via Toll é principalmente ativada por bactérias Gram-positivas, fungos e vírus, enquanto a IMD por bactérias Gram-negativas (TZOU et al., 2002; HOFFMAN; REICHHART, 2002; Xi et al., 2008). Outro fator de transcrição, o STAT e a via de sinalização da qual faz parte, a JAK-STAT, têm papel importante na ativação da resposta imune dos artrópodes contra uma variedade de patógenos (BARILLAS-MURY et al., 1999; DOSTERT et al., 2005; MOLINA-CRUZ et al., 2008; SOUZA-NETTO et al., 2009). Outro grupo de FT vinculado a aspectos imunológicos é o GATA. Estes fatores de transcrição possuem este nome, por se ligarem a sequências de DNA (A/T) GATA (A/G). São encontrados em uma diversidade de grupos de organismos como, por exemplo, fungos, plantas e animais. Atuam em diversas funções como: desenvolvimento, diferenciação e proliferação. Fatores de transcrição do tipo GATA apresentam papel na imunidade contra diferentes patógenos em *D. melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (TINGVALL et al., 2001; KERRY et al., 2006; SENGER et al., 2006; SHAPIRA et al., 2006).

### 2.7.3.1 Via JAK-STAT

A via JAK-STAT foi descrita primeiramente em mamíferos como tendo um papel importante em respostas antivirais (DUPIUS et al., 2003, KARST et al., 2003, HO et al., 2005). Em *D. melanogaster*, esta via possui funções descritas tanto na imunidade como no desenvolvimento. Regula diversos processos relacionados com a embriogênese, como o desenvolvimento dos olhos, a segmentação embrionária e a manutenção de células-tronco (ARBOUZOVA; ZEIDLER, 2006). Esta via é também ativada após infecção dos artrópodes com vírus, bactérias e plasmódios (BARILLAS-MURY et al., 1999; DOSTERT et al., 2005; MOLINA-CRUZ et al., 2008; SOUZA-NETTO et al., 2009). Além disso, sua participação na resposta imune celular, através da regulação da proliferação de hemócitos e na diferenciação de prohemócitos, já foi demonstrada (HANRATTY; DEAROLF, 1993; HARRISON et al., 1995; KRZEMIEN et al., 2007).

A via JAK-STAT em *D. melanogaster* é ativada após a ligação de moléculas do tipo citocinas da família *unpaired* (UpD) ao receptor transmembrana Domless, homólogo do receptor de citocinas tipo I de mamíferos. Essa ligação causa uma alteração conformacional do receptor que leva à fosforilação de proteínas JAK, associadas a estes receptores. As proteínas JAK ativadas fosforilam Dome, resultando na formação de sítios de ligação para as proteínas citoplasmáticas STAT. O recrutamento das STAT pelo complexo JAK-Dome induz sua fosforilação e dimerização. Os dímeros formados migram para o núcleo e promovem a transcrição de genes efetores. Essa via é finamente regulada por dois reguladores negativos, a proteína inibitória de STAT ativado (*Protein inhibitor of activated STAT* - PIAS) e o supressor de sinalização por citocinas (*Suppressor of cytokine signaling* – SOCs) (ARBOUZOVA; ZEIDLER, 2006). Alguns dos produtos finais desta via já são conhecidos. Em *D. melanogaster* foi mostrado que esta via ativa a transcrição do gene TEP2 e de genes de

estresse do tipo Turandot. Enquanto a função de Turandot permanece desconhecida, é sabido que TEP2 possui homologia com as proteínas do sistema complemento de mamíferos e é importante na opsonização de patógenos (LAGUEUX et al., 2000; BOUTROS et al., 2002; AGAISSE et al., 2003).

### 2.7.3.2 Via IMD

A via IMD foi descoberta através da observação de um mutante de *D. melanogaster* susceptível a bactérias gram-negativas, mas resistente a bactérias gram-positivas e fungos (LEIMATRE et al., 1995). Este variante foi chamado de mutante com deficiência imunológica (*Immune deficiency* - IMD) e a proteína mutada recebeu o nome de IMD e veio a dar nome à via. Nenhuma outra função além da ligada à imunidade do inseto foi descrita para esta via. Esta via apresenta similaridades com a via TNF-R de mamíferos. A via IMD é ativada de modo parecido à via Toll. O receptor transmembranar da via de IMD parece ser uma proteína reconhecadora de peptidoglicana de cadeia longa (*Peptidoglycan recognition protein long chain* - PGRPLC). Apesar deste receptor não possuir domínios de interação proteína-proteína em sua porção citoplasmática, acredita-se que, ao ser ativado, se ligue a algum co-fator que possui domínios de interação com proteínas que serão responsáveis pela passagem do sinal para a via IMD. Portanto, a ativação do receptor pelos PAMPs é capaz de recrutar as proteínas adaptadoras IMD, FADD e a caspase DREDD. Uma vez em proximidade, DREDD cliva IMD, deixando um o resíduo N-terminal A31 exposto. Esse resíduo exposto permite a ligação da IMD a DIAP2. Em conjunto com as enzimas E2 conjugadoras de ubiquitina (*E2-ubiquitin-conjugating enzymes*), UEV1a, Bendless (Ubc13) e Effete (Ubc5), IMD (e um pouco DIAP2) são, então, poliubiquitiniladas (PAQUETTE et al., 2010). Essas cadeias de poliubiquitinas induzem a ativação de quinases [os complexos formado por dTAK1 (*TGF- $\beta$ -activated kinase 1*) e TAB (*TAK1 binding protein*)] e IKKb-IKKg que darão continuidade ao sinal (KLEINO et al., 2005; PAQUETTE et al., 2010). A proteína dFadd liga-se então a DREDD, que, por sua vez, se associa e cliva a proteína Relish fosforilada. A fosforilação de Relish é realizada pelo complexo kinase iKB que é ativado pela MAPKKK TAK1. Uma vez clivada, Relish libera sua porção C-terminal (inibidora de sua translocação para o núcleo), da porção C-terminal. Sua entrada no núcleo promove a transcrição de genes efetores como os PAM. Recentemente, foi demonstrado que a via IMD controla a resistência de anofelinos a *P. falciparum* (GARVER et al., 2009).

### 2.7.3.3 Via Toll

Receptores Toll foram descritos pela primeira vez em *D. melanogaster*. Em 1997 foi identificado e caracterizado um homólogo da proteína Toll em humanos sendo denominado de receptor Toll-like (MEDZHITOV et al., 1997). A partir desta data, dez receptores Toll humanos foram identificados e classificados (TLR1-10) exercendo papel importante na detecção e reconhecimento de patógenos e na indução de atividade antimicrobiana pela ativação dos sistemas de imunidade inata e adquirida (ARANCIBIA et al., 2007; BOWIE, 2007), porém, enquanto todos TLRs de humanos possuem funções relacionadas à imunidade, somente alguns TLRs de inseto possui função imune (ILMER; ZHENG, 2004).

Os receptores Toll-like 1, 2, 4, 5, 6 estão presentes na membrana plasmática, de modo que eles contêm domínios intracelular, devido à presença de proteínas do tipo TIR e extracelular (repetições ricas em leucina - LRR), enquanto que os receptores Toll-like 3, 7, 8, 9 e 10 estão localizados intracelularmente, ou seja, nos endossomos e não possuem domínio extracelular. O domínio TIR é a porção citoplasmática e apresenta uma alta similaridade com



a porção citoplasmática dos receptores da família de Interleucina-1 (IL-1) e por isso seu domínio é chamado de Toll/IL-1 (TIR) requerido para iniciar a geração dos sinais intracelulares. Apenas desta similaridade, a porção extracelular de ambos receptores é estruturalmente diferente.

Alguns receptores Toll-like funcionam aos pares de modo que esta associação forma um receptor ativo simples. O dímero TLR1-TLR2 reconhece os PAMPs de bactérias gram-positivas, incluindo lipoproteínas, lipopeptídeos, peptidoglicanos e o ácido lipoteicoico. A associação TLR2-TLR6 é responsável pelo reconhecimento do ácido lipoteicoico da parede de bactérias gram-positivas e do zimosan (polissacarídeo derivado de fungos). O dímero TLR4-TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias gram-negativas, a proteína F de alguns vírus e outros constituintes do hospedeiro como os oligossacarídeos do ácido hialurônico e o fibrinogênio. O dímero TLR7-TLR8 é responsável pelo reconhecimento do RNA viral de fita simples do vírus da gripe. O TLR2 reconhece o glicosilfosfatidilinositol de alguns parasitos, a exemplo do *Trypanosoma cruzi*. O TLR3 liga-se à fita dupla do RNA viral. O TLR5 reconhece a flagelina de algumas bactérias gram-positivas e negativas. O TLR9 é responsável pelo reconhecimento do DNA bacteriano e viral. Em relação ao TLR10, sua função permanece desconhecida (KUMAR et al., 2009; PAPADIMITRAKI et al., 2007). Cada receptor Toll-like tem sua própria via de sinalização intrínseca e induz respostas biológicas específicas contra microrganismos.

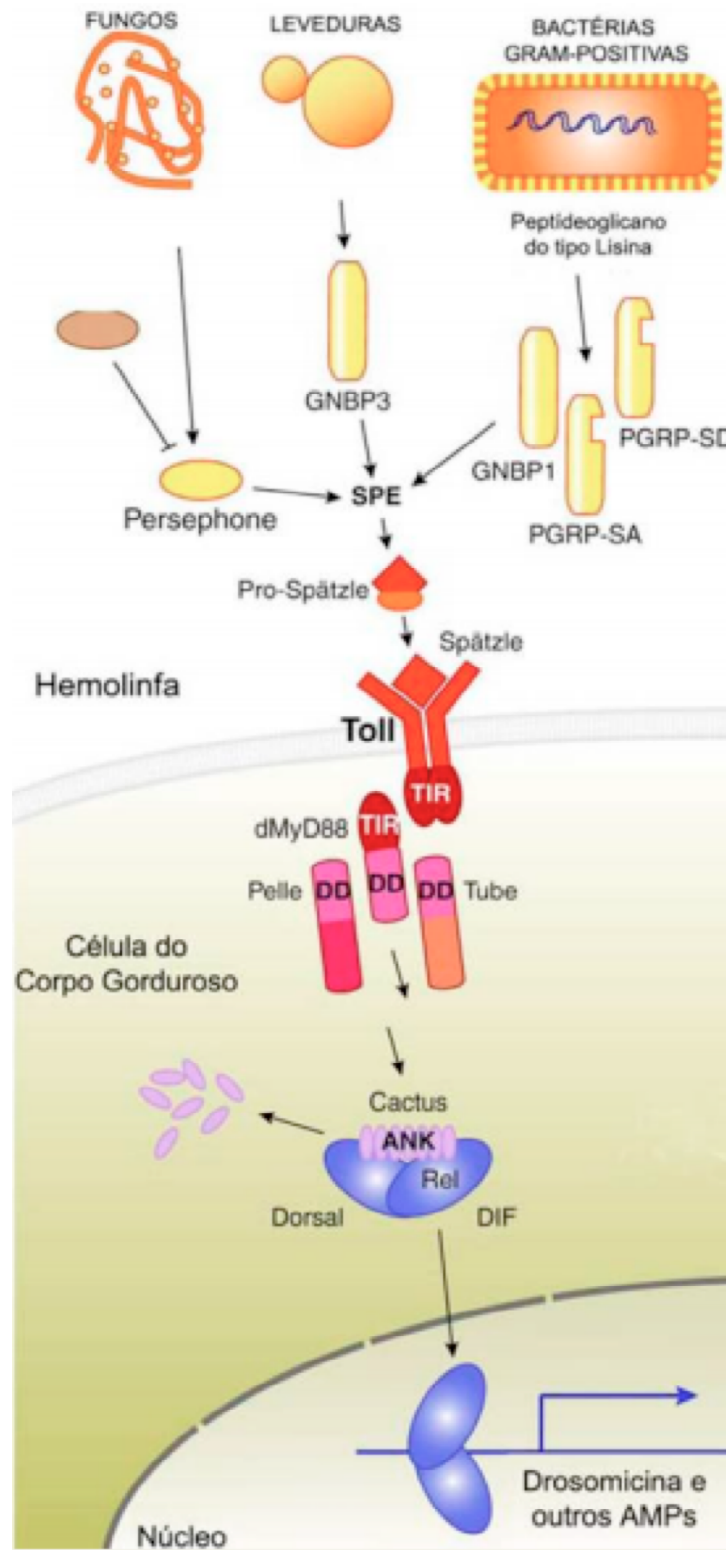
Em *D. melanogaster*, esta via, além de funções imunes como a produção de peptídeos antimicrobianos e antifúngicos, desempenha funções relacionadas à ontogenia (BELVIN; ANDERSON, 1996; LEMAITRE et al., 1996). A via Toll em *D. melanogaster*, como vista na **figura 4**, é muito similar à cascata ativada pela citocina IL-1 e TLRs de vertebrados, o que sugere uma origem comum para estas duas vias. A via de sinalização Toll é desencadeada pela ligação de PAMPs de microrganismos como bactérias ou fungos a PRRs (PGRPs ou GNBPs). Essa ligação ativa uma cascata de serino proteases que cliva a proteína Spatzle. A ligação da Spatzle (clivada) ao receptor Toll (que contém repetições de leucina, LRRs - *leucine-rich repeats*) faz com que o receptor sofra alterações conformacionais que resultam no recrutamento de pelo menos três proteínas com domínios *Death* (MyD88, Tube e Pelle). MyD88 e Tube compartilham o domínio TIR semelhante à Toll e possivelmente interagem diretamente. Pelle contém um domínio adicional de serina-treonina quinase e por isso pode estar envolvido na via de degradação proteolítica de Cactus, proteína homóloga a I $\kappa$ B. A degradação do repressor negativo da via permite que as proteínas homólogas ao NF- $\kappa$ B, Dorsal (maioria dos artrópodes) e Diff (*Drosophila*), se transloquem para o núcleo e promovam a transcrição de genes efetores, como por exemplo, o PAM drosomicina (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).

Embora os receptores do tipo Toll em *D. melanogaster* estejam envolvidos com o reconhecimento dos patógenos, eles não podem ser considerados um RPR, uma vez que foi identificado apenas um ligante deste receptor, a forma clivada da proteína “Spatzler”. Diferentemente de *Drosophila*, em vertebrados, os receptores do tipo Toll são considerados RPRs, pois eles se ligam diretamente aos PAMPs (LAVINE; STRAND, 2002).

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

Estudos realizados com mutantes de *Drosophila* Toll-deficientes mostraram aumento

da susceptibilidade ao fungo *B. bassiana* (TZOU et al., 2002), porém os mecanismos de mediação de resistência da via Toll contra este entomopatógeno ainda não estão estabelecidos (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).



**Figura 4.** Desenho esquemático da Via toll de *Drosophila melanogaster* modificado de LEMAITRE e HOFFMANN, 2007).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Carrapatos

Fêmeas de *R. (B.) microplus* completamente ingurgitadas, denominadas teleóginas, foram obtidas de bovinos infestados artificialmente e mantidos em baias localizadas na Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON), do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, situada em Seropédica - RJ, entre os paralelos 22°49' e 22°45' de latitude sul, e os meridianos 43°38' e 43°42' de longitude oeste de Greenwich, com altitude de 33 metros e clima subtropical.

No 21° dia após a infestação, as fêmeas ingurgitadas oriundas de queda natural foram coletadas do piso das baias dos bezerros e levadas ao Laboratório de Controle Microbiano, lavadas em água corrente e posteriormente imersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos para assepsia da cutícula. Após serem secas em papel toalha, as fêmeas foram submetidas aos tratamentos e mantida em placas de Petri em estufa tipo Demanda Biológica de Oxigênio (B.O.D.) à temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$ .

#### 3.2 Identificação e Alinhamento de Receptores Toll-Like e suas Regiões TIR

A fim de identificar genes de *R. (B.) microplus* que codificam possíveis homólogos de receptores Toll, pesquisamos através do uso do algoritmo (tblastn na versão 2.1) genes indexados de *R. (B.) microplus* no banco de dados disponível em <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html>.

Para tal usamos como pergunta as sequências do domínio TIR (Toll/receptor interleucina-1) de Toll8-like de *Anopheles gambiae* (XP\_551799.2) e TollD de *Drosophila melanogaster* (NP\_733166.1) em busca de transcritos homólogos, visto que o genoma do carrapato bovino não foi ainda sequenciado. Foram identificadas duas sequências de EST (*expressed sequences tag*) que correspondem a sequências parciais que codificam os domínios C-terminais de possíveis receptores Toll com elevada similaridade com as sequências utilizadas como sonda, denominadas RmToll-like (CV447238) e RmToll8-like (TC23602) (TIGR *B. microplus* Gene Index). Nós detectamos outros EST com repetições de sequências ricas em leucina (LRR) e domínios de receptores Toll, mas restringimos a nossa análise aos EST contendo a sequência TIR, considerada a assinatura de receptores “toll-like”. Tal pesquisa foi realizada em 2008, quando este trabalho foi iniciado.

Recentemente um grupo de cientistas ligados ao INCT-EM (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular) fez um novo transcriptoma de tecidos deste animal. Para tal foi extraído mRNA de glândula salivar, ovários, corpo gorduroso, singânglio, células digestivas de fêmeas teleóginas e separadamente de fêmeas partenóginas e embriões e este material foi utilizado para produzir bibliotecas de cDNA para sequenciamento.

A análise pós-genômica dos dados deste sequenciamento está sendo coordenada pela Dra Glória Regina Cardoso Braz, com a colaboração do Dr. José Marcos Ribeiro, NIAID, NIH – USA e do Dr. Rafael Dias Mesquita, IQ-UFRJ. Como este ectoparasito ainda não teve seu genoma sequenciado, este tipo de estratégia nos permitiu obter informações mais completas sobre seus genes expressos. Foi realizada uma busca neste banco de dados utilizando como sequências pergunta as sequências previamente encontradas no TIGR *B. microplus* Gene Index nos levou a obter a sequência completa referente ao gene RmToll-like.

O Alinhamento foi realizado utilizando o algoritmo Clustall-W2 de múltiplas sequências foi realizado comparando as sequências de proteínas dos dois homólogos *R. (B.)*

*microplus* (RmToll-like e RmToll8-like) e os domínios correspondentes a isoformas de receptores Toll de *D. melanogaster* (DmTollC-NP\_001262995.1, DmTollB-NP\_524518.1, DmTollD-NP\_733166.1, DmToll4-NP\_523519.2, DmToll6-NP\_524081.1, DmToll7-NP\_523797.1, DmToll9-NP\_649214.1, DmTollo-NP\_524757.1, DmTehao-NP\_477438.1, Dm18weeler-NP\_476814.1, DmMstProx-NP\_649719.2), *Aedes aegypti* (AaToll-XP\_001655730.1, AaToll-XP\_001663801.1, AaToll-XP\_001653990.1, AaToll-XP\_001660216.1, AaToll-XP\_001658507.1, AaToll-XP\_001658496.1, AaToll-XP\_001650338.1, AaToll-XP\_001649813.1, AaToll-XP\_001647905.1, AaToll-XP\_001649808.1, AaToll-XP\_001648238.1), *Ixodes scapularis* (IxToll-XP\_002400628.1, IxToll8-XP\_002402229, IxToll-XP\_002406803, IxToll-XP\_002406802, IxTollA-XP\_002399580.1, IxToll-XP\_002406804, IxToll-XP\_002400887), *Homo sapiens* (HsToll-like4-NP\_612564.1, HsToll-like2-NP\_003255.2, HsToll-like5-NP\_003259.2, HsToll-like10-NP\_112218.2, HsToll-like9-NP\_059138.1, HsToll-like1-NP\_003254.2, HsToll-like7-NP\_057646.1, HsToll-like3-NP\_003256.1, HsToll-like8-NP\_619542.1, HsToll-like6-NP\_006059.2), *Anopheles gambiae* (AgToll-XP\_309197, AgToll-AAL37901.1, AgToll-like6-XP\_320172.2, AgToll-like5-XP\_560220.3, AgToll-like7-XP\_320221.4, AgToll-like1A-XP\_311355.3) e *Rhipicephalus pulchellus* (RpToll-like-JAA59716.1, RpToll-like6-JAA63491.1) estas sequências foram obtidas no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Uma árvore filogenética foi construída utilizando-se o algoritmo baseado no método de “Neighbour-joining”, através do método de comparação de nucleotídeos de Jukes-Cantor e analisadas pelo método de bootstrap com 500 replicações, para isso utilizou-se o programa Mega 5.0 (KUMAR et al., 2004).

### 3.3 Coleta da Hemolinfa

Fêmeas completamente ingurgitadas foram incubadas a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR  $\geq 80\%$  até a coleta da hemolinfa. Para a coleta da hemolinfa, a superfície dorsal da cutícula das fêmeas ingurgitadas foi perfurada com auxílio de agulha de insulina 0,3 mm. Com uma suave pressão sobre o corpo do carrapato, a hemolinfa foi coletada com um capilar de vidro 0,3 mm acoplado a uma borracha flexível, que apresentava uma ponteira estéril em sua outra extremidade. Em seguida, a hemolinfa foi transferida para microtubos e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até serem processadas.

### 3.4 Dissecção do Corpo Gorduroso

Para a obtenção dos corpos gordurosos, as fêmeas completamente ingurgitadas foram dissecadas sob microscópio estereoscópico. Primeiramente cada exemplar de *R. (B.) microplus* foi pressionado na região anterior com o auxílio de uma pinça estéril. A cutícula anterior foi cuidadosamente cortada utilizando-se um bisturi, evitando-se dessa forma o rompimento dos órgãos internos. A fêmea então foi imersa em solução salina tamponada estéril preparado com água apirogênica (PBS - 8 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $12\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 mM de NaCl e 2,7 mM de KCl, pH 7,2) e os órgãos foram empurrados para fora com o auxílio de uma pinça estéril. Em seguida, o corpo gorduroso foi separado dos demais órgãos internos e transferido para microtubos e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até serem processados.

### 3.5 Dissecção de Célula Digestiva

Fêmeas completamente ingurgitadas foram dissecada em PBS gelado estéril.

Primeiramente cada exemplar de *R. (B.) microplus* foi pressionado na região anterior com o auxílio de uma pinça. A cutícula anterior foi cuidadosamente cortada utilizando-se um bisturi, evitando-se dessa forma o rompimento dos órgãos internos. A fêmea então foi imersa em PBS gelado e os órgãos foram empurrados para fora com o auxílio de uma pinça. Em placas de Petri estéreis as células digestivas foram separadas a partir da parede do intestino. As células foram cuidadosamente recolhidas utilizando uma pipeta de 1mL, lavadas três vezes com o mesmo tampão e então colocadas em microtubos e armazenadas a -20°C até serem processadas.

### 3.6 Dissecção de Glândula Salivar

Fêmeas parcialmente ingurgitadas foram fixadas em placa de Petri com duas agulhas e foram feitas incisões ao longo das margens de seu escudo dorsal, visando abertura com exposição de seu aparelho digestivo. Procedeu à identificação, separação e remoção das glândulas salivares, colocando-as em microtubos e armazenadas a -20°C até serem processadas.

### 3.7 Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) de Células e Tecidos de Carrapato

O RNA das células e tecidos de teleóginas de *R. (B.) microplus* foi extraído após os tratamentos usando Reagente Tryzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi submetido ao tratamento com DNase I (Fermentas) e o cDNA foi sintetizado usando um kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Os oligonucleotídeos foram desenhados no programa *Primer-blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e sintetizados pela Invitrogen Life Technologies (Tabela 1). O qPCR foi realizado em uma StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems) usando Power SYBR® Green PCR Master MIX (Applied Biosystems), de acordo com as condições a seguir: o mix de reação contendo os oligonucleotídeos RmToll-like e RmToll8-like foi pré-incubado durante 5 min a 96°C, e amplificado por 40 ciclos de desnaturação a 96°C durante 45s, e hibridação a 52°C durante 45s e extensão a 72°C durante 45s. O mix de reação contendo os oligonucleotídeos para Microplusina (FOGACA et al., 2004), Defensina (FOGACA et al., 2004; ESTEVES et al., 2009) e Ixodidina (FOGACA et al., 2004) foram pré-incubados durante 5min a 96°C, e amplificados por 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 40s, e hibridação a 60°C durante 30s e extensão a 72°C durante 1min.

Todas as reações de qPCR foram realizadas em triplicata, em três experimentos independentes em placas de 96 poços. O Método de comparação de Ct foi utilizado para comparar as alterações nos níveis de expressão de genes (Livak e Schmittgen, 2001). Actina foi utilizada como controle endógeno. A análise estatística utilizada foi one-way ANOVA, teste de Tukey.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos gene específico utilizado na qPCR. Desenhados usando *primer-blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e sintetizados pela *Invitrogen life Technologies*.

Nome	Sequência (5'-3')
RmToll- <i>like</i> -F	ACTGTTGAGGACCAAATTGC
RmToll- <i>like</i> -R	TTTCTTGGAGGTGCCACTAC
RmToll8- <i>like</i> -F	TACCGACGCCAACTGAAGCT
RmToll8- <i>like</i> -R	CTACACGTTTCCAGCTCAGCAG
Microplusina-F	TGAAGGCCATCTTGTGTCCG
Microplusina-R	TGGTCGTGCTCATGGTGGGCTTC
Defensina-F	GCAAGAAGGTTGCTAAAATGCG
Defensina-R	TGCTAAAGTAAAGCGCAGTGT
Ixodidina-F	CAAAATGCAGTCCCGTTACGT
Ixodidina-R	TGCCGCACTGGTTGAAGAC
Drosomicina- <i>like</i> -F	CATATGCCTTGTCTTCGTCC
Drosomicina- <i>like</i> -R	GTGTCTGTGACAGGCTCCTT
$\beta$ -Actina-F	CGTTCCTGGGTATGGAATC
$\beta$ -Actina-R	ACGTCGCACTTCATGATGG
$\beta$ -Tubulina-F	TCCTTCGTACGGTGACCTGA
$\beta$ -Tubulina-R	CGAGCTTGCGAAGATCAGAG

### 3.8 Western Blot

As amostras de tecidos e células de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* foram homogeneizadas em tampão de lise gelado (PBS contendo 0,01 % Triton-20 e inibidor de protease: 2 mM PMSF (Fluoreto de fenilmetilsufonil) e coquetel de inibidor de proteases *Complete* (Roche). Posteriormente, as amostras foram desnaturadas pela adição de tampão de amostra (50 mM Tris pH 6,8, 2% SDS (sodium dodecyl sulfate), 0,1% Bromophenol e 10% glicerol) e 100 mM DTT (Dithiothreitol). As amostras são incubadas a 100°C por 8 minutos e centrifugadas, (13.000 g, 5 min, 4°C) para descartar os debris. Então, o precipitado foi descartado e o sobrenadante acondicionado a -80°C, até o uso.

Antes do tratamento de desnaturação, uma alíquota de cada homogenato foi utilizada para quantificação de proteína total pelo método de Lowry modificado (MARKWELL et al., 1978). Quantidades iguais de proteínas (40µg) de cada homogenato foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels electrophoresis) 10% no tampão de corrida (25mM Tris, 250 mM glicina e 0,1% SDS) com corrente constante de 30 mA. As amostras separadas no gel são transferidas para membrana de PVDF (Biorad) em voltagem constante de 80 V, com o tampão de transferência (25mM Tris, 250mM glicina, 0,1% SDS e 20% de metanol).

Após a transferência, a membrana foi lavada em TBS-T (Tris 50 mM, NaCl 0,1 M, Tween 0,05%, pH 7,2) e depois incubada por 1 hora a temperatura ambiente com PBT (solução salina tamponada contendo Tween) contendo 1,5% de BSA (Albumina de soro bovino) para

bloquear ligações inespecíficas. A membrana foi então incubada com anticorpo primário policlonal, feito em coelho, anti-Toll (d-300) (Santa Cruz) na diluição 1:500, por uma noite a 4°C. Após lavagens em TBS-T a membrana foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação contínua, na presença de um anticorpo secundário, anti-coelho conjugado à peroxidase na diluição 1:2.000 em TBS-T.

Após as lavagens a membrana foi incubada com um substrato quimioluminescente da Pierce (SuperSignal West Pico) por 4 minutos sob agitação a temperatura ambiente. A revelação foi realizada em um sistema de revelação da Kodak, utilizando filme Bio Max *light-1 film* para a detecção da quimioluminescência.

Para garantir um carregamento de proteína equivalente, as membranas tiveram os anticorpos desligados em 200mM de tampão de glicina-HCL contendo SDS a 1%, pH 2,2, à temperatura ambiente, e re-sondadas com anticorpo anti- $\alpha$ Tubulina (DM1 $\alpha$ , Sigma, 1:4.000).

Os níveis de proteína Toll foram determinadas por análise densitométrica em computador utilizando a função histograma de *Photoshop* e normalizados contra tubulina.

Os resultados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi one-way ANOVA, teste de Tukey.

### **3.9 Marcação com Anticorpo – Microscopia Confocal**

As amostras de tecidos e células de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* foram dissecadas em PBS gelado e fixadas por 40 minutos em PBS contendo 4% de formaldeído (Merck) a temperatura ambiente. O material foi lavado em PBT (PBS + Tween 0.01 %) e então bloqueado por 1 hora com 5% soro normal de cabra (Vector) em PBT a temperatura ambiente.

As amostras foram incubadas por uma noite com o anticorpo policlonal primário de coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) na diluição de 1:100 e anticorpo monoclonal primário de camundongo anti-actina (Cell Signaling) na diluição 1:400 a 4 °C. Subsequentemente os corpos gordurosos foram lavados em PBT e incubados por 2 horas com anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 feito em cabra anti-coelho e Alexa Fluor 647 de burro anti-camundongo na diluição 1:400 a temperatura ambiente. Para marcação do núcleo utilizou DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) na diluição 1:500.

Para obtenção de imagens as amostras foram mantidas em glicerol 70% em água e fotografadas usando um microscópio confocal Leica SP5.

### **3.10 Obtenção e Manutenção dos Isolados Fúngicos**

Os isolados dos fungos entomopatogênicos utilizados nos experimentos foram *Beauveria bassiana* (Bb 986), isolado do carrapato *R. (B.) microplus* e cedido pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (USP), Brasil e o fungo *Beauveria bassiana* (Bb 22), isolado do carrapato *R. (B.) microplus* cedido pelo Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária da UFRRJ, onde ambos são mantidos.

Para o presente bioensaio, estes isolados foram repicados em placas de Petri (95 mm x 15 mm) contendo meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) (Merck) e mantidos em estufa regulada a 25  $\pm$ 1°C e umidade relativa  $\geq$  80% por 15 dias. Decorrido esse período, as placas foram armazenadas em refrigerador sob temperatura de 5°C até a realização dos bioensaios.

### 3.11 Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase-Trancryptase Reversa (RT-PCR) de *B. bassiana* 968

Para obtenção da amostra de *B. bassiana* 986 a placa contendo o fungo foi raspada com o auxílio de uma espátula, e 50 mg do fungo foram depositado em um cadinho, onde foi adicionado nitrogênio líquido, em seguida procedeu-se a maceração até a obtenção de um pó branco o qual foi transferido para um microtubos.

Posteriormente foi adicionado 1mL de Reagente Tryzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) prosseguindo com a extração do RNA seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi submetido ao tratamento com DNase I (Fermentas) e o cDNA foi sintetizado usando um kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Os oligonucleotideos foram desenhados no programa *primer-blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e sintetizados pela *Invitrogen Life Technologies* (Tabela 1). O PCR foi realizado em uma Veriti 96 well thermal cycler (Applied Biosystems) usando PCR Master Mix (2x) (Fermentas) de acordo com as condições a seguir: pré-incubados durante 5min a 96°C, e amplificada por 40 ciclos de desnaturação a 96°C durante 45s, e hibridação a 52°C durante 45s e extensão a 72°C durante 45s.

### 3.12 Elaboração das Suspensões e Quantificação dos Inóculos

A suspensão conidial foi preparada a partir do crescimento dos isolados em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA. Para realização da suspensão fúngica na concentração  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>, a superfície da placa de Petri foi raspada com auxílio de um alça e uma lâmina de bisturi para retirada dos conídios, que foram suspensos em 10mL de PBS estéril preparado com água apirogênica e em seguida foram homogeneizados por três minutos no vortex. Um volume de 10µL da suspensão foi colocada na Câmara de Neubauer e examinada sob microscópio de luz, para a quantificação dos conídios segundo Alves (1998).

### 3.13 Viabilidade das Suspensões de Conídios

Uma alíquota de 10µl da suspensão na concentração  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> do isolado de *B. bassiana* foi colocada em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e antibiótico cloranfenicol 0,5% (500 mg de cloranfenicol :1 litro de meio de cultura). As placas foram mantidas em estufa tipo (B.O.D) sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  e avaliadas após 24 horas para quantificação da viabilidade dos conídios. O cálculo da germinação dos conídios foi realizado segundo Alves (1998). Os conídios das suspensões dos isolados de *B. bassiana* utilizadas nos bioensaios apresentaram de 80 a 100% de germinação após 24 h de incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR  $\geq 80\%$ , demonstrando que os fungos estavam aptos a serem utilizados.

### 3.14 Bioensaio com Teleóginas Desafiadas com *Beauveria bassiana*

No 21º dia após a infestação, as teleóginas oriundas de queda natural foram coletadas do piso da baia dos bezerros, lavadas em água corrente e posteriormente imersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos para assepsia da cutícula. Após serem secas em papel toalha, as teleóginas com peso entre 0,2 e 0,28g foram selecionadas para o bioensaio e separadas em grupos homogêneos.

Para a homogeneização do peso das fêmeas ingurgitadas destinadas ao tratamento, o número de classes foi calculado através da fórmula de Yule (SAMPALHO, 2002), em função do



número de observações (n). Para a formação dos grupos, uma fêmea de cada classe foi escolhida aleatoriamente.

Quatro grupos foram formados para o bioensaio: um controle que não sofreu injúria, um grupo controle inoculado apenas com PBS apirogênico estéril, um grupo tratado com suspensão na concentração de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *B. bassiana* inativada pelo calor (autoclavada a 121°C por 20 minutos) e outro grupo inoculado com suspensão na concentração de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> com *B. bassiana* viável. Para o bioensaio realizado com a *B. bassiana* 986, foram realizados três experimentos independentes em triplicata, já com a *B. bassiana* 22 foi realizado um experimento em triplicata. Foram inoculados 5 µL de PBS e das suspensões na hemocele das teleóginas no forame localizado entre o capitulo e o escudo dorsal, com auxílio de microscópio estereoscópico, e utilizando-se seringa de insulina *ultra fine*.

### 3.15 Reisolamento do Isolado Fúngico após o Bioensaio

Uma amostra de fêmeas ingurgitadas de cada tratamento foi colocada em câmara úmida para propiciar o crescimento fúngico sobre suas cutículas. Após sete dias, as colônias fúngicas que cresceram sobre a cutícula dos cadáveres das fêmeas foram semeadas em meio de cultura BDA acrescido de cloranfenicol (0,05%) e incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR  $\geq 80\%$  durante 15 dias (SAMSON; EVANS, 1982). Decorrido esse período, foi realizada a avaliação das características micromorfológicas através da utilização da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula (RIVALIER; SEYDEL, 1932). As placas com as culturas foram mantidas sob as mesmas condições de temperatura e umidade durante 14 dias. Decorrido esse período, foram confeccionadas lâminas temporárias coradas em Lactofenol de Amman com azul de algodão (HAWKSWORTH, 1977) para a identificação dos fungos. As amostras de fêmeas de *R. (B.) microplus* submetidas ao tratamento com o isolado fúngicos de *B. bassiana*, apresentaram desenvolvimento de colônias fúngicas após 10 dias de incubação em câmara úmida, confirmando que o fungo penetrou e se desenvolveu nos diferentes estágios do carrapato. E como esperado, as amostras utilizadas no grupo controle não demonstraram desenvolvimento de colônias.

### 3.16 Bioensaio com Teleóginas Desafiadas com Zimosan

No 21º dia após a infestação, as teleóginas oriundas de queda natural foram coletadas do piso da baia dos bezerros, lavadas em água corrente e posteriormente imersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos para assepsia da cutícula. Após serem secas em papel toalha, as teleóginas com peso entre 0,2 e 0,28g foram selecionadas para o bioensaio e separadas em grupos homogêneos.

Para a homogeneização do peso das fêmeas ingurgitadas destinadas ao tratamento, o número de classes foi calculado através da fórmula de Yule (SAMPAIO, 2002), em função do número de observações (n). Para a formação dos grupos, uma fêmea de cada classe foi escolhida aleatoriamente.

Quatro grupos foram formados para o bioensaio: um controle que não sofreu injúria, um grupo controle inoculado apenas com PBS apirogênico estéril, um grupo tratado com 5 µg de zimosan (Sigma) que foi preparada em PBS a partir de uma solução estoque (5,8mg/mL).

Foram realizados experimentos em triplicata. Foram inoculados 5 µL na hemocele das teleóginas no forame localizado entre o capitulo e o escudo dorsal, com auxílio de microscópio estereoscópico, e utilizando-se seringa de insulina *ultra fine*.

### 3.17 Curva de Sobrevivência

A estimativa de mortalidade das teleóginas foi observada diariamente. No primeiro bioensaio, quatro grupos cada um contendo 20 teleóginas foram formados: por um grupo controle que não sofreu injúria, um grupo controle inoculado apenas com PBS apirogênico estéril, um grupo tratado com suspensão na concentração de  $10^6$  conídios/mL de *B. bassiana* 986 inativada pelo calor (autoclavada a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos) e outro grupo inoculado com suspensão na concentração de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> com *B. bassiana* 986 viável. Estes foram mantidos em placas de Petri sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$ . Os animais mortos foram quantificados e colocados em câmara úmida para permitir o desenvolvimento e exteriorização do fungo, visando à confirmação do agente e propiciar o reisolamento do fungo após o bioensaio.

No segundo bioensaio, grupos contendo 15 teleóginas foram formados: por um grupo controle que não sofreu injúria, um grupo controle que somente sofreu injúria, um grupo controle inoculado apenas com PBS apirogênico estéril e os grupos tratados foram inoculados com 5 $\mu\text{L}$  contendo 5 $\mu\text{g}$ , 25 $\mu\text{g}$  e 50 $\mu\text{g}$  zimosan. Comparações com controles foram feitos usando o teste de análise Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

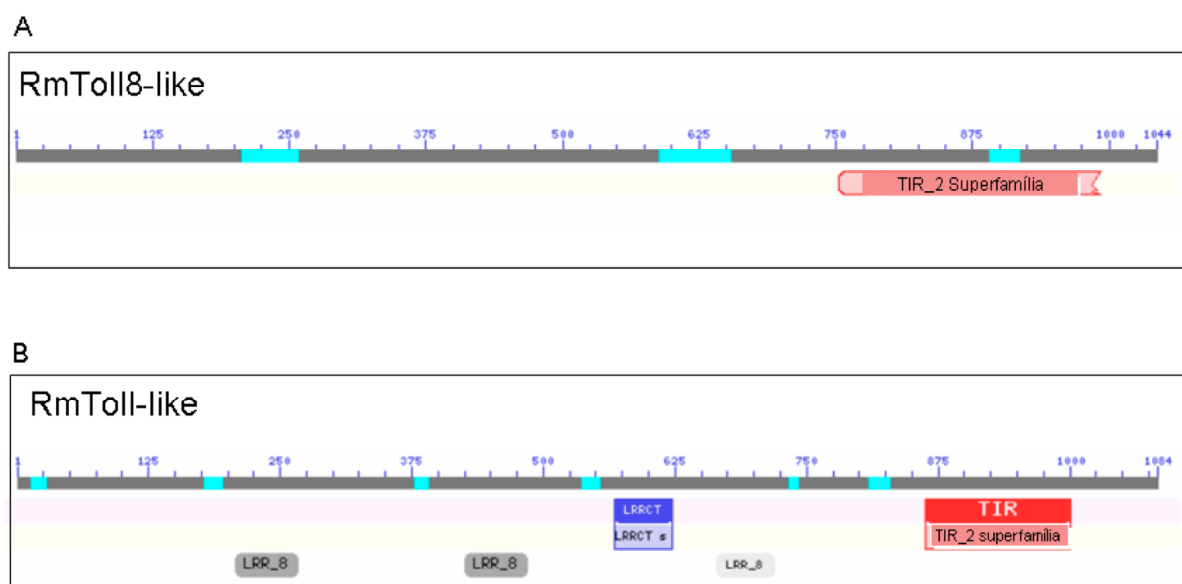
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Identificação e Alinhamento de Receptores Toll-Like e suas Regiões TIR

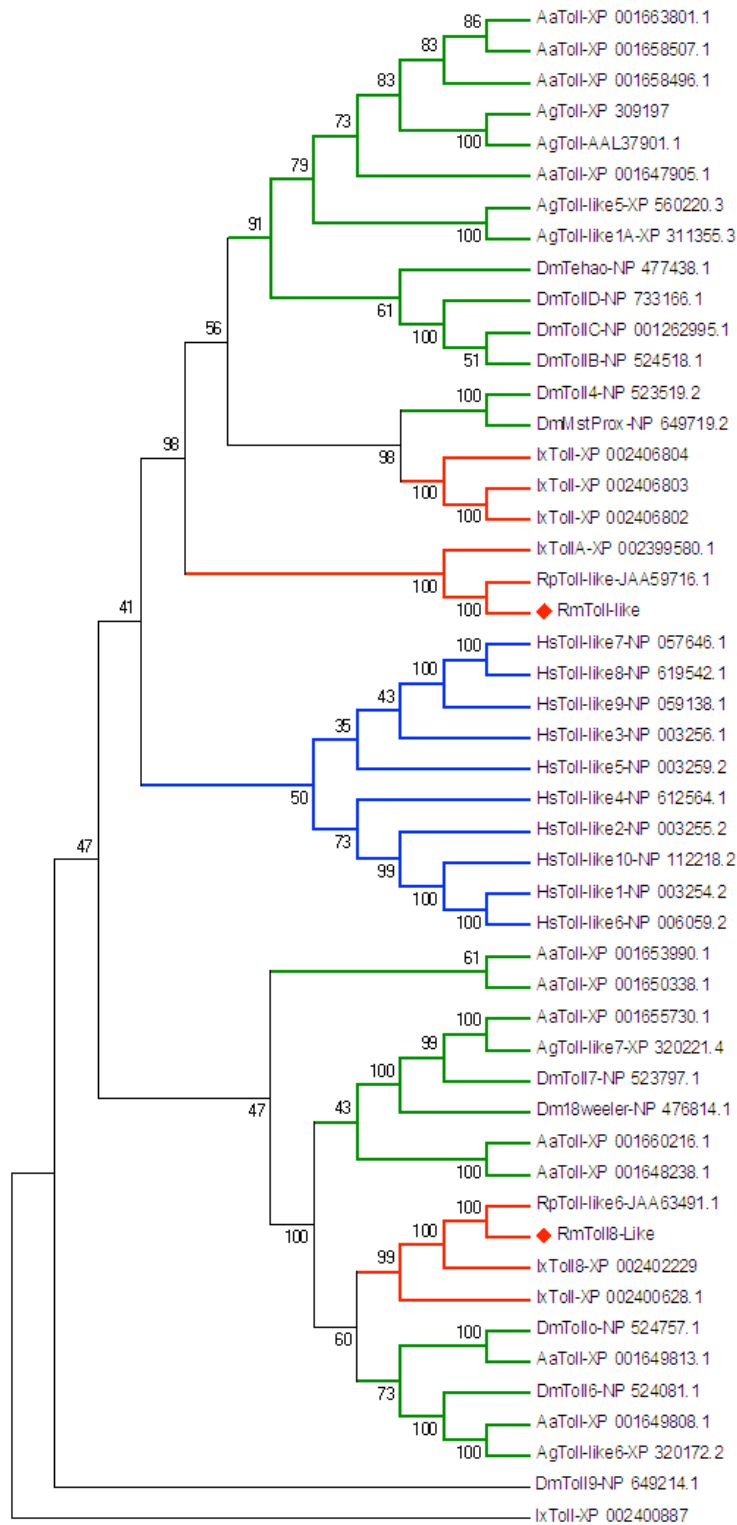
A busca realizada no banco de dados do novo transcriptoma utilizando como sequências pergunta as sequências previamente encontradas no TIGR *B. microplus* Gene Index nos levou a obter a sequência completa referente ao gene RmToll-like. Não achamos a sequência completa do gene RmToll8-like (**Figura 5**).

Com o objetivo de verificar se as sequências por nós obtidas eram ortólogos de proteínas toll ou toll-like de outros organismos alinhamos as sequências de proteínas de *R. (B.) microplus* com as sequências de proteínas Toll derivadas de genes de diferentes organismos utilizando o algoritmo Clustal-W2. No alinhamento das sequências de proteínas RmToll-like e RmToll8-like deduzidas de *R. (B.) microplus* com as sequências de proteínas de genes de *D. melanogaster*, *Aedes aegypti*, *Ixodes scapularis*, *Homo sapiens*, *Anopheles gambiae* e *Rhipicephalus pulchellus*, podemos observar alta similaridade entre elas, especificamente entre os domínios conservados, como, a região rica em leucina (LRR) e o domínio TIR (**Anexo A**).

A árvore filogenética gerada a partir desse alinhamento mostrou as sequências de proteínas agruparam-se em três grandes grupos. Dois grandes grupos formados pelos insetos como *D. melanogaster*, *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* destacados em verde na **figura 6**, que mostraram grande proximidade entre si, no qual os carrapatos então inseridos. As duas sequências de interesse a RmToll-like e a RmToll8-like de *R. (B.) microplus* agrupou-se juntamente com os demais carrapatos *R. pulchellus* e *I. scapularis*, apresentando um bootstrap de 100 com o carrapato do mesmo gênero em vermelho na **figura 6**. E o outro grupo revelado, foi com as sequências de *Homo sapiens*, destacados em azul na **figura 6**.



**Figura 5.** Esquema das sequências das proteínas RmToll-like (A) e RmToll8-like (B) e suas regiões conservadas LRR\_8 (Repetição Rica em Leucina), LRRCT (Repetição Rica em Leucina domínio C-terminal), TIR (Domínio TIR Toll/receptor interleucina-1) obtidas em (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

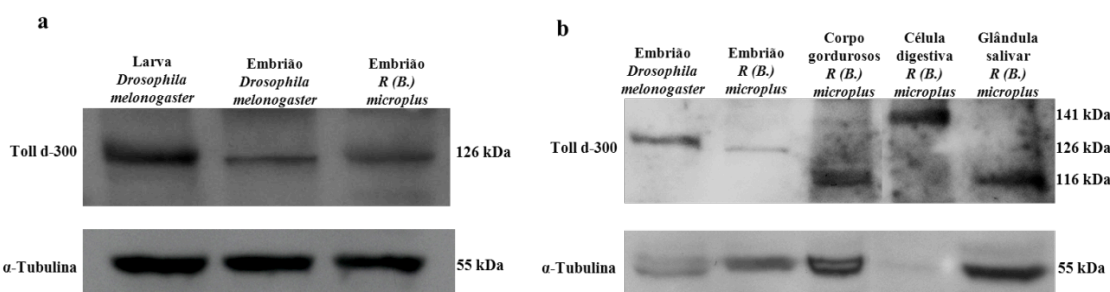


**Figura 6.** A árvore filogenética construída a partir do alinhamento das sequências obtidas no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, de *Drosophila melanogaster* (Dm), *Aedes aegypti* (Aa), *Ixodes scapularis* (Ix), *Homo sapiens* (Hs), *Anopheles gambiae* (Ag) e *Rhipicephalus pulchellus* (Rp). Utilizou-se o algoritmo baseado no método de “Neighbour-joining”, através do método de comparação de nucleotídeos de Jukes-Cantor e analisadas pelo método de bootstrap com 500 replicações, através do programa Mega 5.0. Em destaque ♦ as sequências de proteínas dos dois homólogos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (RmToll-like e RmToll8-like).

## 4.2 Toll-Like em Carrapato

Devido ao interesse do nosso grupo de pesquisa no estudo do sistema imune inato do carrapato *R. (B.) microplus*, investigamos a presença de receptores Toll-like nos principais órgãos envolvidos neste processo, como corpo gorduroso, célula digestiva e glândula salivar.

Confirmamos a expressão deste receptor através da técnica de *western blot* com anticorpo policlonal Toll (d-300), onde mostramos a presença de uma proteína Toll-like em embrião, célula digestiva e corpo gorduroso das fêmeas totalmente ingurgitadas e em glândula salivar de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *R. (B.) microplus* (Figura 7). Quando analisamos as amostras de larva e embrião de *D. melanogaster* e embrião de carrapato observamos a presença de uma banda com um peso molecular de 126 kDa para todas as amostras analisadas (Figura 7a). Ao analisarmos as amostras de corpo gorduroso, glândula salivar e célula digestiva, notamos que houve uma variação em relação aos pesos moleculares. Detectamos as mesmas bandas de 126 kDa em embrião de *D. melanogaster* e embrião de *R. (B.) microplus*. A análise por *western blot* detectou a migração de banda de proteína dupla e única no corpo gorduroso e glândula salivar do carrapato, respectivamente, estas com 116 kDa (Figura 7b). A banda correspondente a célula digestiva apresentou peso molecular mais elevado de 141 kDa quando comparado com outros tipos celulares (Figura 7b).

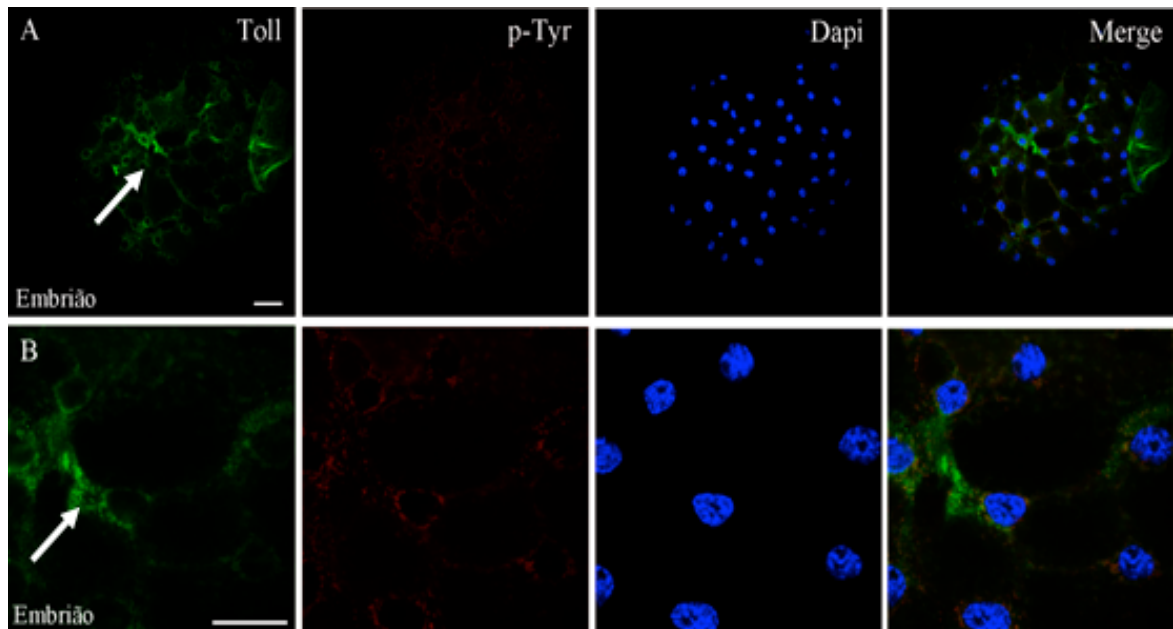


**Figura 7.** Proteína Toll-like em embrião, célula digestiva e corpo gorduroso das fêmeas totalmente ingurgitadas e em glândula salivar de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por *Western blot*. 40  $\mu$ g de proteína separadas por gel 10% SDS-PAGE (a) amostras sem Dtt e (b) amostras com Dtt. As amostras foram eletrotransferidas para membrana de PVDF (Biorad). As membranas foram incubadas com anticorpo primário policlonal, feito em coelho, anti-Toll (d-300) (Santa Cruz) na diluição 1:500, por uma noite a 4 °C. Em seguida incubadas com anticorpo secundário, anti-coelho conjugado a peroxidase na diluição 1:2.000. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com o substrato chemoluminescent (Pierce) durante 4 minutos à temperatura ambiente, e, em seguida, exposto a filme Bio Max light-1 (Kodak).

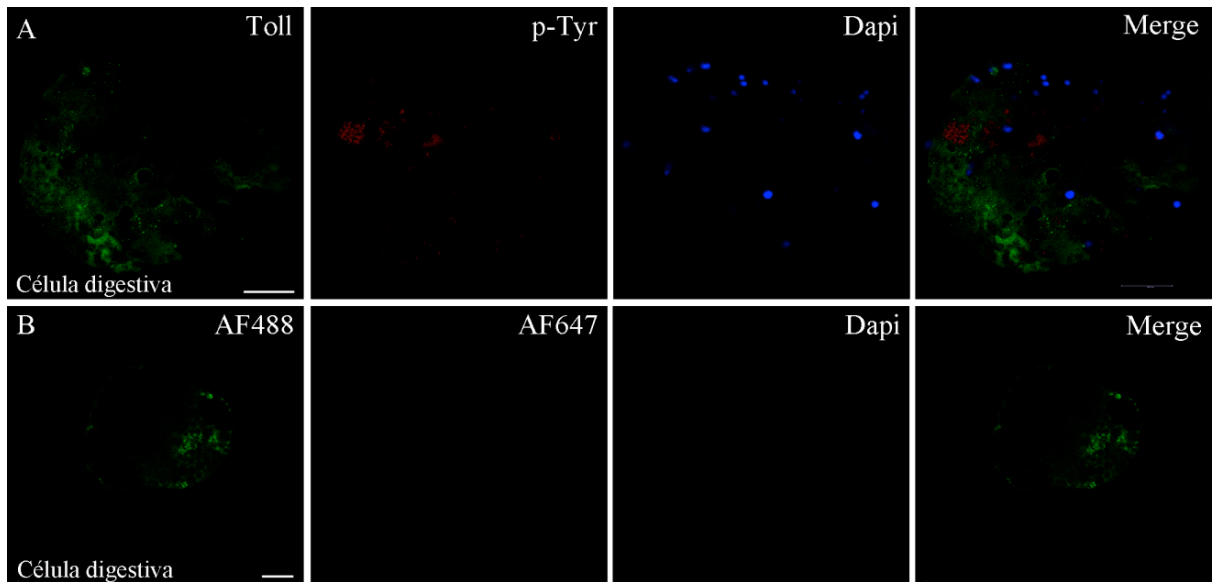
Outra técnica utilizada para confirmar a presença e a localização desta proteína nas células e tecidos de fêmeas de *R. (B.) microplus* foi a técnica de microscopia confocal, onde as amostras foram incubadas com anticorpo policlonal Toll (d-300) contra Toll de *D. melanogaster*. Como controle positivo para o funcionamento do anticorpo, utilizamos amostras de embriões de *D. melanogaster*. Os resultados mostraram fluorescência para em embriões de *D. melanogaster* e de carrapato (Figura 8). Entretanto, na microscopia em célula digestiva não foi possível quantificar a marcação exata, pois houve marcação inespecífica quando incubamos as amostras somente com o anticorpo secundário (Figura 9).

Os resultados mostraram a proteína Toll é difusa no citoplasma ou concentrada nas vesículas intracelulares nas glândulas salivares, em parte, co-localizada com coloração de fosfo-tirosina (Figura 10). Observou-se também a presença de marcação de Toll no corpo gorduroso. Neste, Toll está presente em trofócitos arredondados, distribuídos na membrana plasmática, e ausentes nos trofócitos cuboidais. Em alguns trofócitos arredondado a marcação

é restrita a vesículas intracelulares, parcialmente co-localizadas com coloração fosfo-tirosina (**Figura 11**).

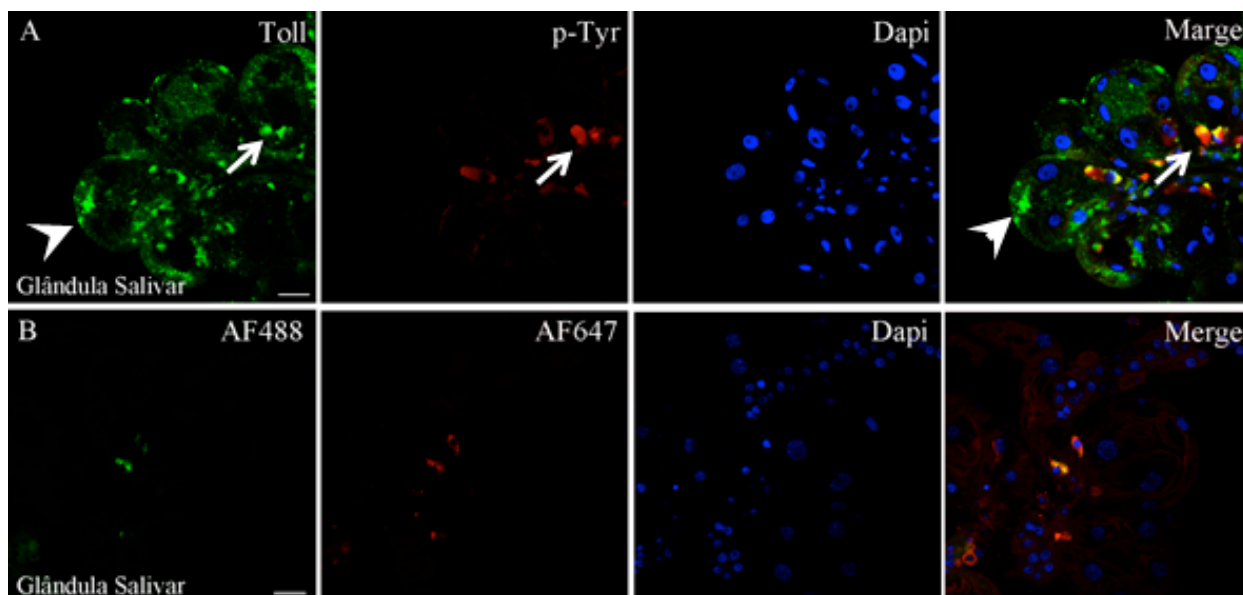


**Figura 8.** Imunomarcação de proteínas Toll-Like (seta) em embriões de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (**A** e **B**) incubados com o anticorpo policlonal primário de coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) 1:100 (**Toll**). Como controle foi utilizado anticorpo policlonal primário camundongo anti-p-Tyrosina (Cell Signaling) 1:400 (**p-Tyr**) e para marcação do núcleo DAPI, 1:500 (**Dapi**). Anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 647, 1:400. **Merge** - sobreposição das imagens. Imagens fotografadas usando microscópio confocal Leica SP5. Barra de escala: **A**-20 $\mu$ m, **B**-40 $\mu$ m.

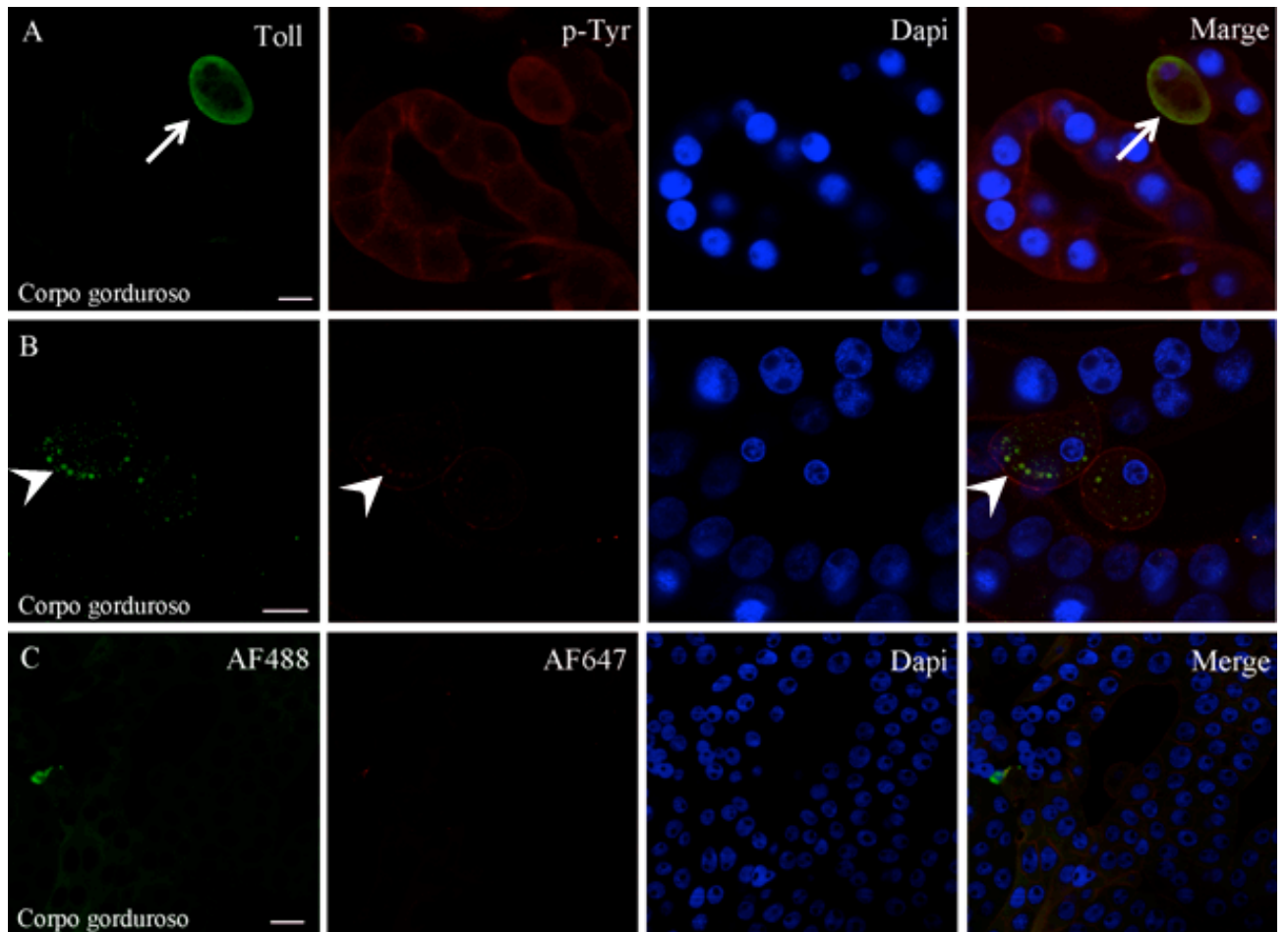


**Figura 9.** Imunomarcacão de proteínas Toll-Like em célula digestiva de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* incubada com o anticorpo policlonal primário coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) 1:100 (**Toll**). Como controle foi utilizado anticorpo policlonal primário camundongo anti-p-Tyrosina (Cell Signaling) 1:400 (**p-Tyr**) e para marcação do núcleo DAPI, 1:500 (**Dapi**). Anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho e Alexa Fluor 647 burro anti-camundongo, 1:400 (**A**). Célula digestiva incubada com anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 647, 1:400 (**B**). **Merge** - sobreposição das imagens. Imagens fotografadas usando microscópio confocal Leica SP5. Barra de escala: **A-B**-40 $\mu$ m.





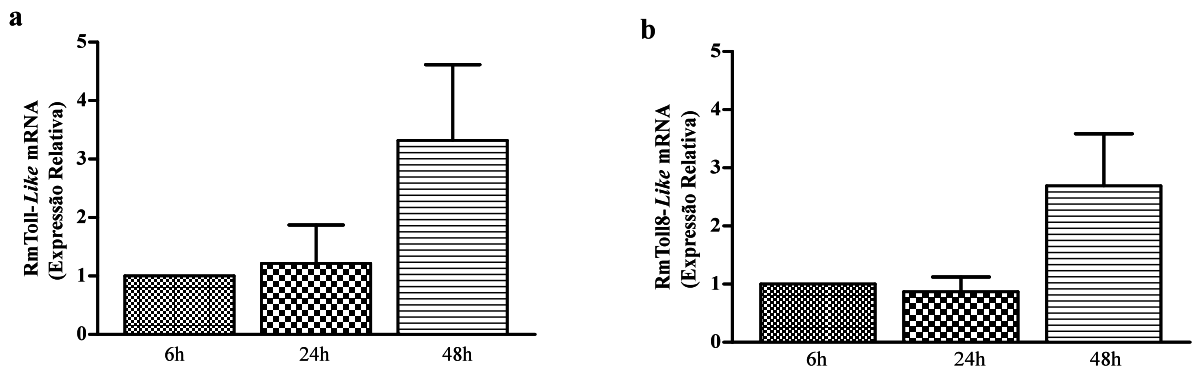
**Figura 10.** Imunomarcção de proteínas Toll-Like em glândula salivar de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Proteína Toll difusa no citoplasma (cabeça de seta) e proteína Toll concentrada nas vesículas intracelulares em parte, co-localizada com coloração de fosfotirosina (seta). Glândulas salivares foram incubadas com o anticorpo policlonal primário coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) 1:100 (**Toll**). Como controle foi utilizado anticorpo policlonal primário camundongo anti-p-Tirosina (Cell Signaling) 1:400 (**p-Tyr**) e para marcação do núcleo DAPI, 1:500 (**Dapi**). Anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho e Alexa Fluor 647 burro anti-camundongo, 1:400 (**A**). Glândula salivar incubada com anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 647, 1:400 (**B**). **Merge** - sobreposição das imagens. Imagens fotografadas usando microscópio confocal Leica SP5. Barra de escala: **A-B**-40 $\mu$ m.



**Figura 11.** Imunomarcacão de proteínas Toll-Like em corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Proteína toll está presente em trofócitos arredondados, distribuídos na membrana plasmática (seta) e em alguns trofócitos arredondado a marcao está restrita a vesículas intracelulares (cabeça de seta) parcialmente co-localizadas com colorao fosfo-tirosina. Corpo gorduroso foi incubado com o anticorpo policlonal primário coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) 1:100 (**Toll**). Como controle foi utilizado anticorpo policlonal primário camundongo anti-p-Tirosina (Cell Signaling) 1:400 (**p-Tyr**) e para marcao do núcleo DAPI, 1:500 (**Dapi**). Anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho e Alexa Fluor 647 burro anti-camundongo, 1:400 (**A e B**). Corpo gorduroso incubado com anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 647, 1:400 (**C**). **Merge** - sobreposio das imagens. Imagens fotografadas usando microscópio confocal Leica SP5. Barra de escala: **A-B**-20µm, **C**-40µm.

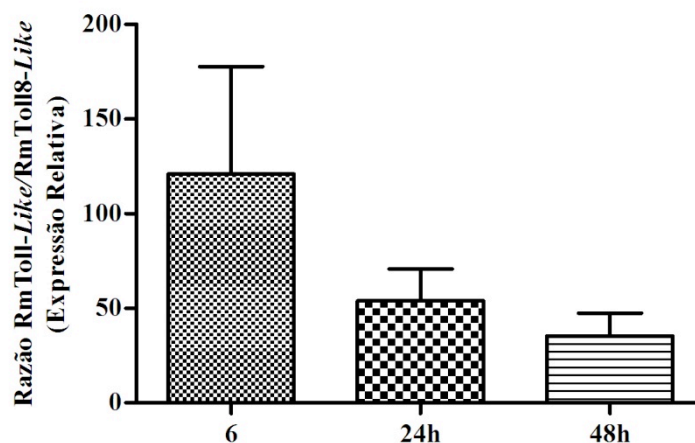
### 4.3 Toll-Like em Corpo Gorduroso

Como corpo gorduroso representa um importante órgão de defesa imune nós optamos por estudar mais profundamente a expressão dos receptores RmToll-like neste tecido 6, 24 e 48 horas após a queda dos carrapatos do bovino. Como podemos observar na **figura 12** houve um aumento, porém, não significativo, dos genes RmToll-like (**Figura 12a**) e RmToll8-like (**Figura 12b**) em corpo gorduroso 48 horas após a queda dos carrapatos dos bovinos, em relação aos outros tempos avaliados.



**Figura 12.** Aumento da expressão dos genes RmToll-like (a) e RmToll8-like (b) por qPCR em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6, 24 e 48 horas após a queda dos carrapatos do bovino. RNA obtido de 4 carrapatos/pool em três experimentos independentes.  $\beta$ -actina foi utilizada como normalizador. Os dados são mostrados média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0.05$ ; one-way ANOVA; teste de Tukey.

Analisamos também a razão entre a expressão destes receptores para saber o quanto os receptores RmToll-like são expressos em relação ao RmToll8-like. Observamos que o receptor RmToll-like é expresso mais de 100 vezes em relação ao receptor RmToll8-like 6h após a queda dos carrapatos do bovino, apesar desta diferença na expressão não ser estatisticamente significativa. Observamos também que com o passar do tempo esta diferença declina, chegando a menos de 50 vezes 48h após a queda (**Figura 13**).

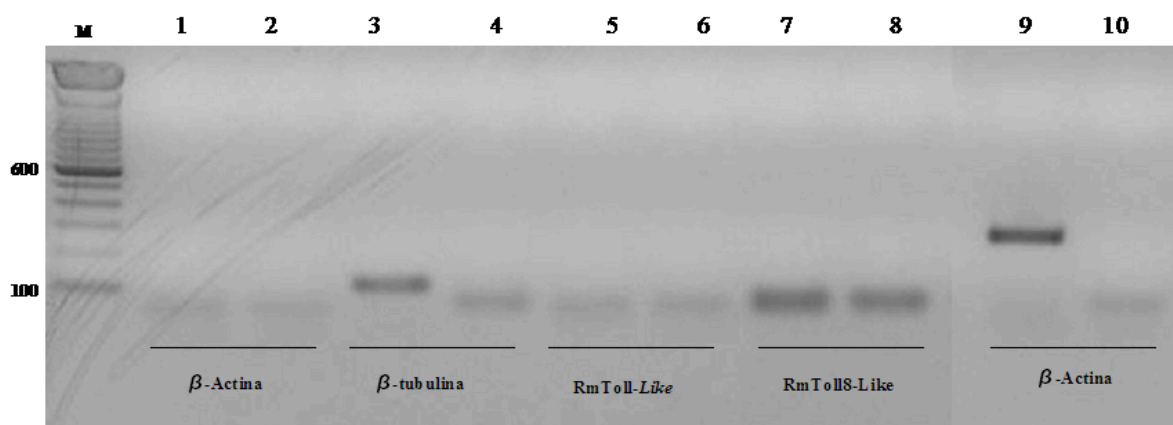


**Figura 13.** RmToll-like é mais expresso em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que RmToll8-like, 6, 24 e 48 horas após a queda dos carrapatos do bovino. RNA obtido de 4 carrapatos/pool em três experimentos independentes, análise da expressão por q-PCR.  $\beta$ -actina foi utilizada como normalizador. Os dados mostrados são média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0.05$ ; one-way ANOVA; teste de Tukey.

#### 4.4 Toll-Like em *Beauveria bassiana* 986

Para confirmar que as seqüências dos genes de Toll-like detectadas em amostras de carrapatos desafiados com fungo seriam apenas seqüências oriundas do próprio carrapato, realizamos um RT-PCR com amostras do fungo *B. bassiana*.

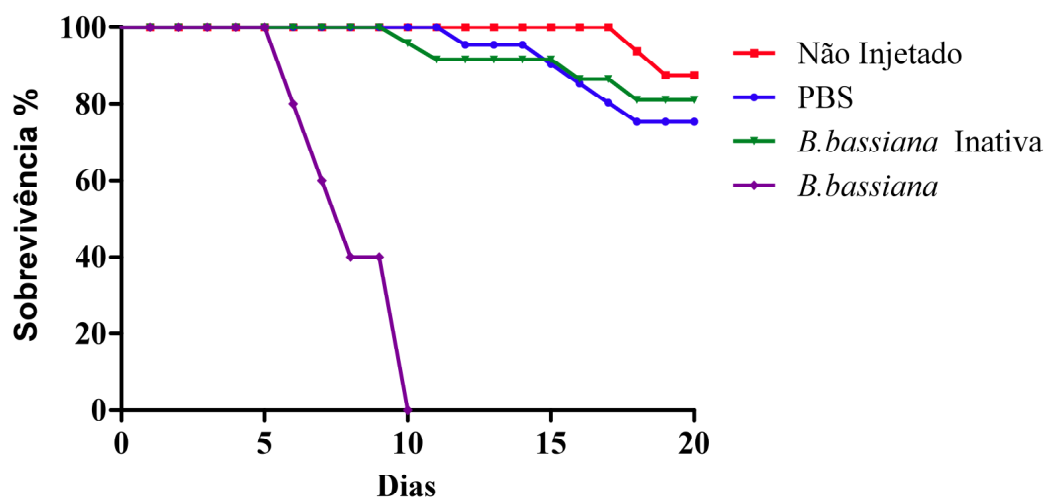
Como podemos ver na **figura 14** o fungo *B. bassiana* não expressa os receptores RmToll-like e RmToll8-like nem actina, uma vez que não houve amplificação para estes genes. Mas podemos ver a presença de tubulina nestes organismos, mostrando que o cDNA estava viável. Como controle usamos um cDNA de corpo gorduroso que amplificou para actina.



**Figura 14.** Ausência de receptor Toll-like em *Beauveria bassiana*. Eletroforese em gel de agarose 1,8% de produtos de amplificação por RT-PCR de cDNA de *Beauveria bassiana* 986 e cDNA de corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Linhas 1, 3, 5 e 7 amostras com cDNA de *Beauveria bassiana*, Linhas 2, 4, 6 e 8 controle negativo sem o cDNA de *Beauveria bassiana*. Linha 9 amostras de cDNA de corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e 10 amostras sem o cDNA de corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* incubados com  $\beta$ -Actina utilizado como controle. M- marcador de peso molecular de 100pb.

#### 4.5 Curva de Sobrevivência de Carrapatos Tratados com *B. bassiana* 986

O percentual de sobrevivência das teleóginas foi observado diariamente, até o 20º dia após a realização do tratamento das mesmas com PBS, *B. bassiana* 986 inativada pelo calor e *B. bassiana* 986 viável (**Figura 15**). Os resultados obtidos mostram que *B. bassiana* 986 viável é patogênica para o carrapato *R. (B). microplus*, causando a mortalidade de todos os indivíduos no 10º dia após o tratamento, enquanto os tratamentos não injetado, inoculado somente com PBS e *B. bassiana* 986 inativada pelo calor não diferiram entre si.

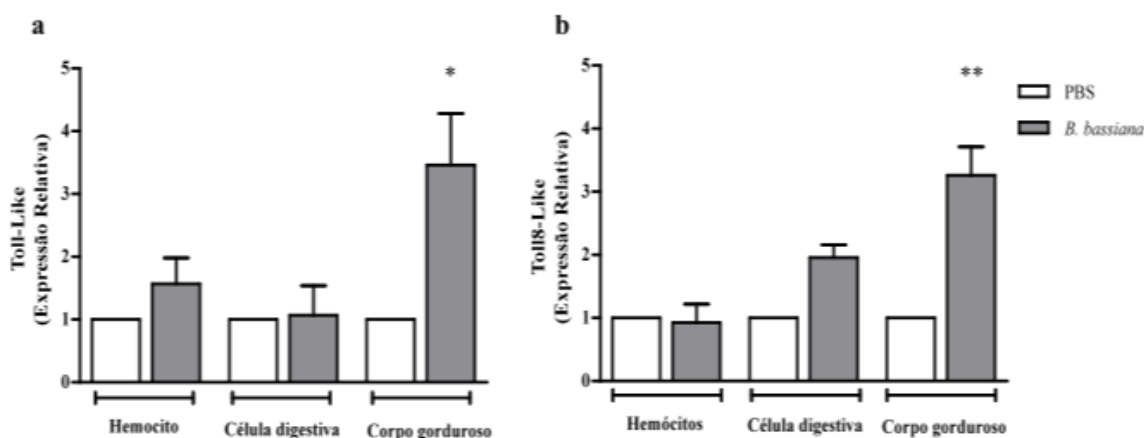


**Figura 15.** Mortalidade de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* após o tratamento com *Beauveria bassiana*. (■) Não injetado; (●) PBS; (▲) *Beauveria bassiana* inativada ( $10^6$  conidi. mL<sup>-1</sup>); (◆) *Beauveria bassiana* ( $10^6$  conidios.mL<sup>-1</sup>). Foram usados 15 carrapatos por tratamento, observados durante 20 dias. Comparações com controles foram feitas usando o teste de análise Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. \*\*\* p < 0,001.

#### 4.6 Toll-Like em Carrapatos Tratados com *B. bassiana* 986

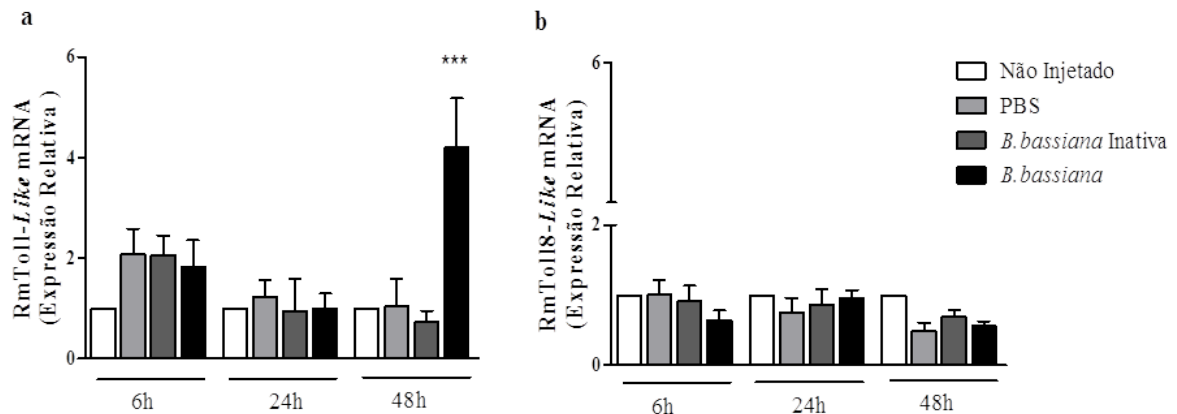
Analizamos a expressão destes receptores nos principais órgãos de defesa como, corpo gorduroso, hemócitos e célula digestiva. A expressão gênica dos receptores Toll-like foi avaliada por qPCR 6h após a infecção por *B. bassiana*.

Verificamos que a expressão dos genes RmToll-like e RmToll8-like foi modulada positivamente no corpo gorduroso em relação ao controle com PBS (**Figura 16a**). Em hemócitos podemos observar um leve aumento da expressão de RmToll-like (**Figura 16b**) e em células digestivas detectamos um aumento da expressão do RmToll8-like após o desafio com o fungo entomopatogênico *B. bassiana* (**Figura 16c**).



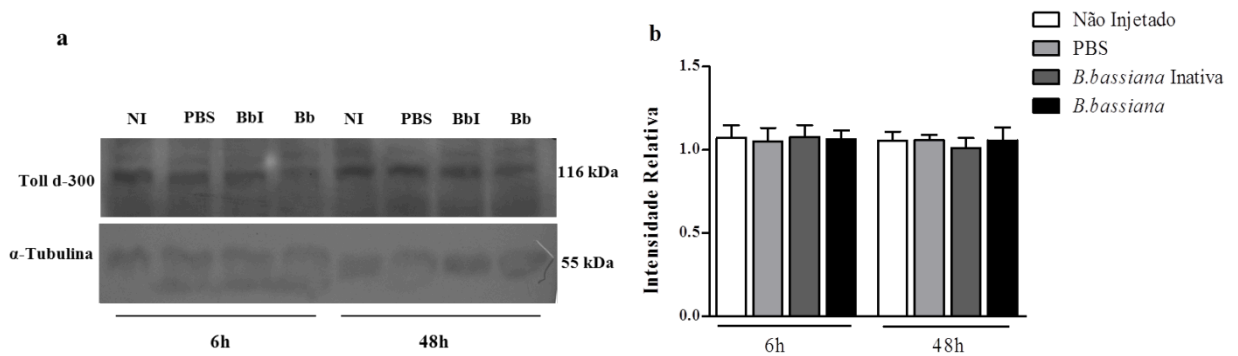
**Figura 16.** Expressão dos genes RmToll-like (a) e RmToll8-like (b) por qPCR em corpo gorduroso, hemócitos e célula digestiva de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6 horas após o tratamento com suspensão de *Beauveria bassiana* 986 na concentração de  $10^6$  conidios.mL<sup>-1</sup>. Foram dissecados 15 carrapatos/pool para hemócito e 4 carrapatos/pool para célula digestiva e corpo gorduroso.  $\beta$ - actina foi utilizada como normalizador. Os dados são mostrados como média  $\pm$  erro padrão. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; one-way ANOVA; teste de Tukey. N=3

A expressão de receptores RmToll-like e RmToll8-like no corpo gorduroso das fêmeas completamente ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, 6, 24 e 48 horas após os desafios com *B. bassiana* foi determinada avaliando o nível de RNAm usando qPCR. Em nosso estudo, observamos um pequeno aumento no nível de RmToll-like 6 horas após o tratamento com PBS, *B. bassiana* inativada pelo calor e *B. bassiana* viável (**Figura 17a**). Após 24 horas não houve diferença dos níveis de expressão em todos os tratamentos. Nós mostramos que a expressão de RmToll-like foi elevada no corpo gorduroso 48 horas após o desafio com *B. bassiana* mostrando um aumento significativo no nível de expressão de aproximadamente 4,5 vezes maior do que a do grupo controle (**Figura 17a**). Em relação ao gene RmToll8-like não houve diferença na expressão nos tempos analisados (**Figura 17b**).



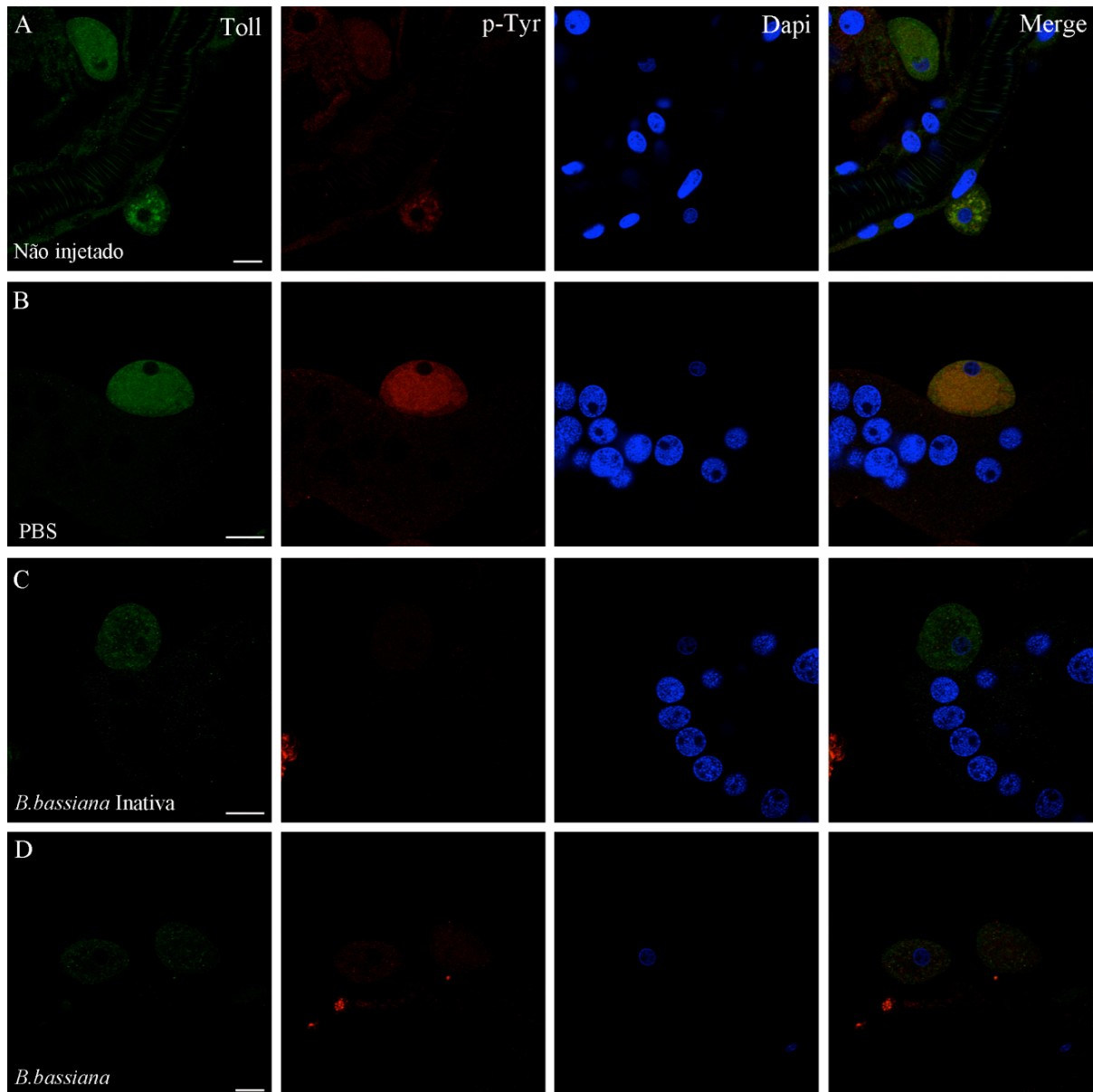
**Figura 17.** Aumento da expressão de RmToll-like em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 48 horas após o desafio com *Beauveria bassiana*. Expressão dos genes RmToll-like (a) e RmToll8-like (b) por qPCR em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6, 24 e 48 horas após o tratamento com PBS, suspensão na concentração  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana* 986 inativada pelo calor e *B. bassiana* 986. Foram dissecados 4 carrapatos/pool em três experimentos independentes.  $\beta$ - actina foi utilizada como normalizador. Os dados são mostrados  $\pm$  erro padrão.\*\*\*  $p < 0,001$ ; one-way ANOVA; teste de Tukey.

Com base nestes resultados fomos avaliar a presença da proteína Toll-like no corpo gorduroso por western blot, para isso escolhemos os tempos de 6 e 48 horas após os tratamento, uma vez que no tempo de 24 horas não obtivemos modulação deste receptores. Como apresentado na **figura 18**, detectamos a presença da proteína Toll-like neste tecido, mas, não foi possível observar diferença significativa em função do tempo de exposição analisado e a concentração do fungo testada.



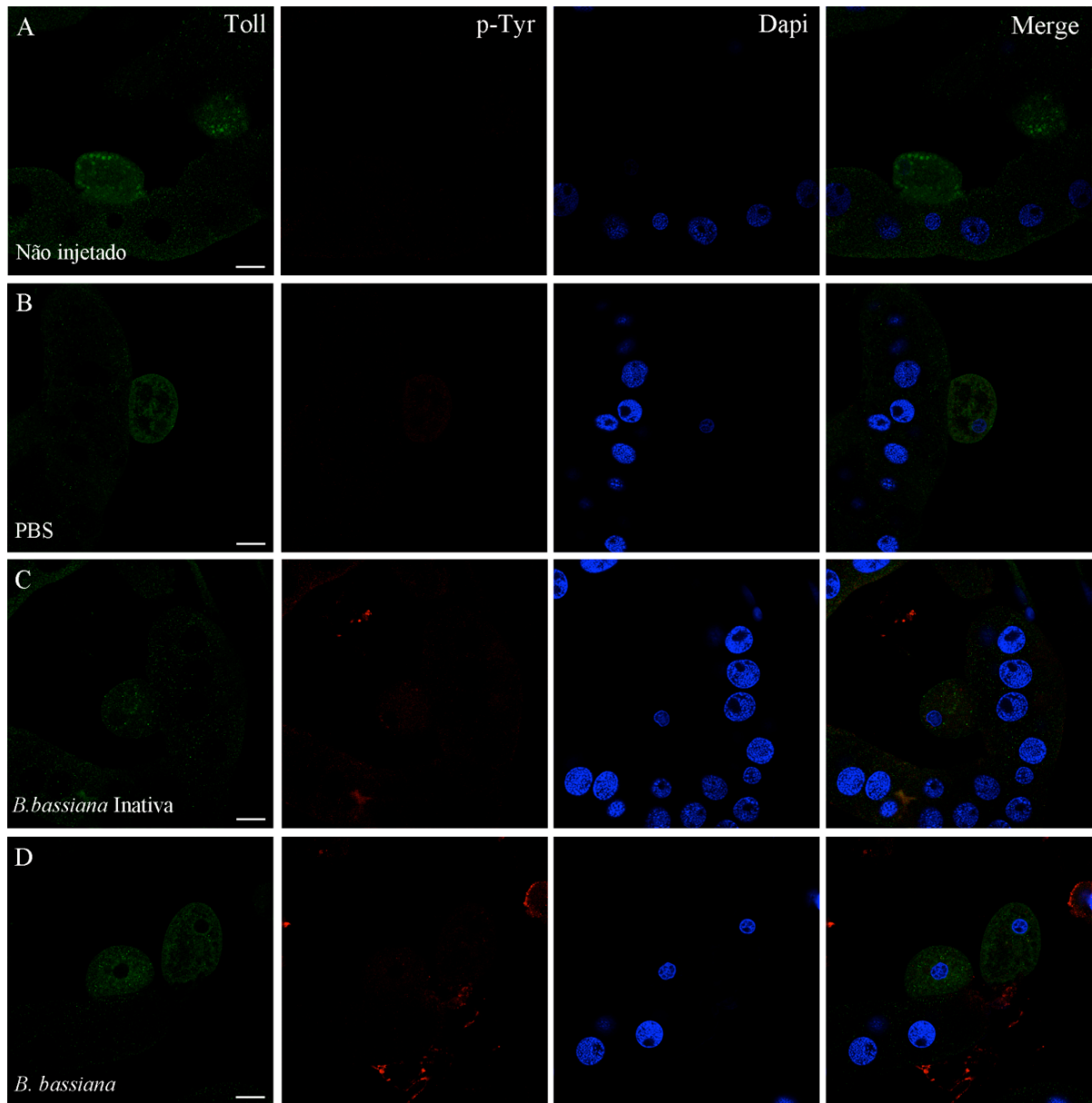
**Figura 18. (a)** *Western Blot* em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6 e 48 horas após o tratamento: não injetado (NI), PBS, suspensão na concentração  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana* inativada (BbI) pelo calor e *Beauveria bassiana* (Bb). 40  $\mu$ g de proteína foram separados por 10% SDS-PAGE e eletrotransferidas para membrana de PVDF (Biorad). Membranas foram incubadas com anticorpo primário policlonal, feito em coelho, anti-Toll (d-300) (Santa Cruz), 1:500, por uma noite a 4 °C. Em seguida incubadas com anticorpo secundário, anti-coelho conjugado a peroxidase, 1:2.000. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com o substrato chemoluminescent (Pierce) durante 4 min à temperatura ambiente, e, em seguida, exposto a filme Bio Max light-1 (Kodak). **(b)** Os níveis de proteína Toll foram determinadas por análise densitométrica em computador utilizando a função histograma de *Photoshop* e normalizados contra tubulina. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão. Comparações com controles foram feitos usando a análise estatística one-way ANOVA, teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ .

A fim de confirmarmos a presença e localização da proteína Toll no corpo gorduroso do carrapato incubamos as amostras deste tecido com anticorpo policlonal Toll (d-300) de *D. melanogaster*, e avaliamos por microscopia confocal. Os resultados encontrados confirmam os mostrados anteriormente por *western blot*, indicando a presença desta proteína, mas mostrando também que não houve diferença em função da concentração do fungo testada e do tempo de exposição analisados, 6 h (**Figura 19**) e 48 h (**Figura 20**). Não observamos aumento na intensidade da marcação, apesar da marcação continuar célula específica como mostrado anteriormente em corpo gorduroso.



**Figura 19.** Imunomarcção de proteínas Toll-Like em corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6 h após os tratamentos: **(A)** não injetado, **(B)** inoculado com PBS, **(C)** inoculado com suspensão  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana* inativada e **(D)** inoculado com suspensão  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana*. Incubado com o anticorpo policlonal primário coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) 1:100 (**Toll**). Como controle foi utilizado anticorpo policlonal primário camundongo anti-p-Tyrosina (Cell Signaling) 1:400 (**p-Tyr**) e para marcação do núcleo DAPI, 1:500 (**Dapi**). Anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho e Alexa Fluor 647 burro anti-camundongo, 1:400. **Merge** - sobreposição das imagens. Imagens fotografadas usando microscópio confocal Leica SP5. Barra de escala: A-20 $\mu$ m, B-C-40 $\mu$ m.





**Figura 20.** Imunomarcção de proteínas Toll-Like em corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 48 h após os tratamentos: **(A)** não injetado, **(B)** inoculado com PBS, **(C)** inoculado com suspensão  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana* inativada e **(D)** inoculado com suspensão  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana*. Incubado com o anticorpo policlonal primário coelho anti-Toll (d-300, Santa Cruz) 1:100 (**Toll**). Como controle foi utilizado anticorpo policlonal primário camundongo anti-p-Tirosina (Cell Signaling) 1:400 (**p-Tyr**) e para marcação do núcleo DAPI, 1:500 (**Dapi**). Anticorpo secundário marcado fluorescentemente (Molecular Probes): Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho e Alexa Fluor 647 burro anti-camundongo, 1:400. **Merge** - sobreposição das imagens. Imagens fotografadas usando microscópio confocal Leica SP5. Barra de escala: **A-B-C** 20µm.

#### 4.7 Peptídeos Antimicrobianos em Carrapatos Tratados com *B. bassiana* 986

Avaliamos a expressão de moléculas efetoras da via Toll como os peptídeos antimicrobianos (PAM), drosomicina-like, microplusina (FOGAÇA et al., 2004; ESTEVES et al., 2009), defensina (FOGACA et al., 2004) e ixodidina (FOGACA et al., 2006).

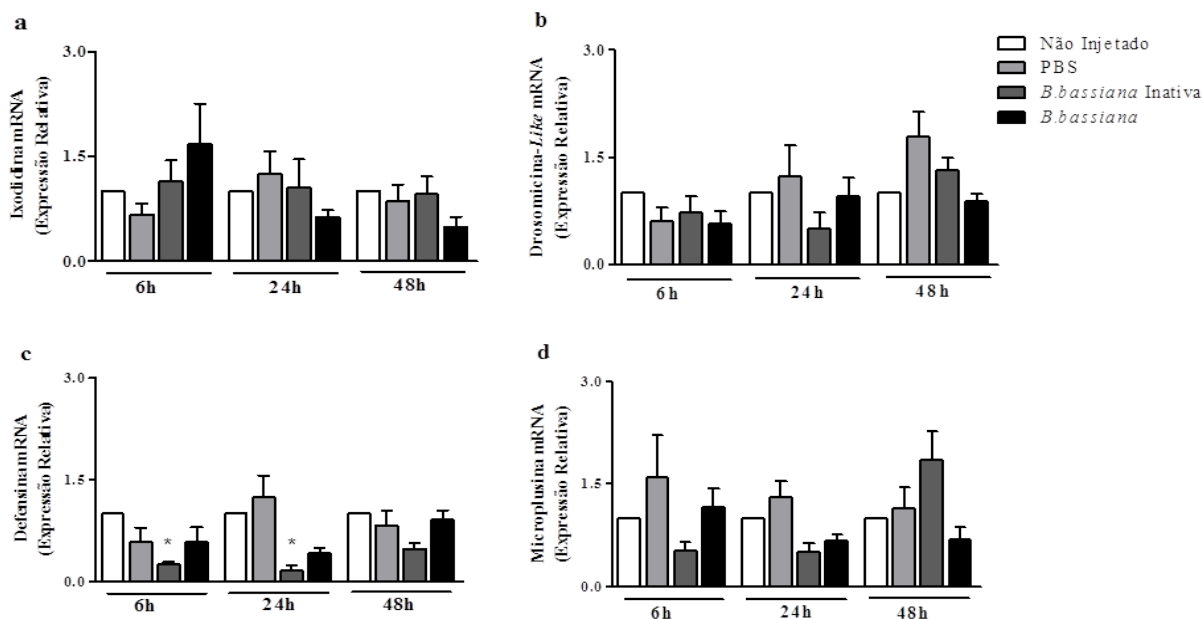
A expressão gênica dos PAM no corpo gorduroso das fêmeas completamente ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, foi avaliada 6, 24 e 48 horas após os desafios com *B. bassiana* 986 através da quantificação do nível de RNAm usando a técnica de qPCR.

Verificamos que a expressão do gene da ixodidina aumentou no corpo gorduroso 6 horas após o tratamento com *B. bassiana*, embora não haja um aumento estatisticamente significativo. Observamos uma diminuição da expressão deste gene em 24 e 48 horas após o estímulo com *B. bassiana* em relação à expressão nos tecidos não tratados (**Figura 21a**).

O gene da drosomicina-like, não apresentou aumento significativo da expressão após o tratamento com *B. bassiana* nos tempos analisados. Observamos uma diminuição da expressão desse gene 24 horas após o tratamento com *B. bassiana* inativa seguida de uma modulação positiva 48 horas após o tratamento, verificamos um aumento da expressão tempo dependente após o tratamento com PBS, embora não haja um aumento estatisticamente significativo (**Figura 21b**).

A expressão do gene da defensina foi inibida significativamente 6, 24 e 48 horas após o tratamento com *B. bassiana* inativada. O mesmo foi observado para o tratamento com *B. bassiana*, onde ocorreu uma inibição da expressão desse gene 6 e 24 horas após o tratamento seguida de um aumento na expressão após 48 horas (**Figura 21c**).

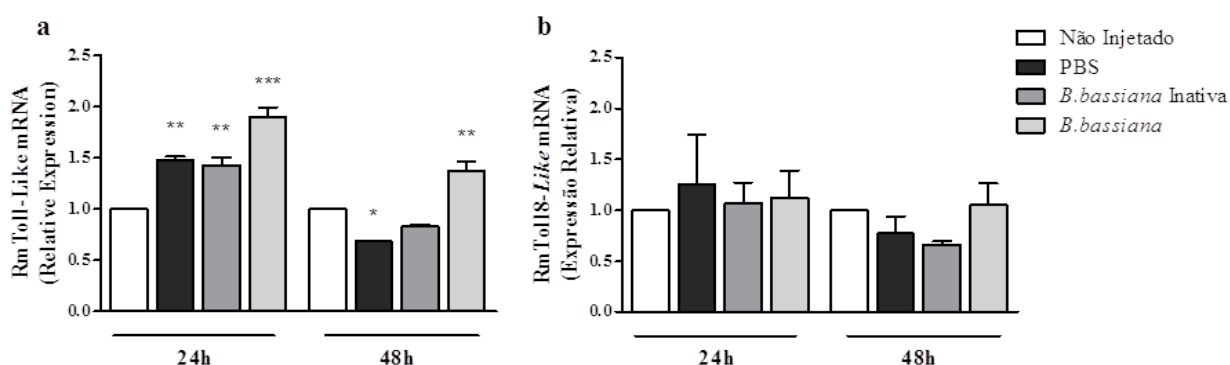
A expressão do gene da microplusina foi inibida 6, 24 horas após o tratamento com *B. bassiana* inativada seguida de um aumento na expressão 48 horas após o tratamento. A expressão do gene da microplusina aumentou no corpo gorduroso 6 horas após o tratamento com *B. bassiana*, seguida da diminuição da expressão deste gene em 24 e 48 horas após o estímulo em relação à expressão nos tecidos não tratados (**Figura 21d**).



**Figura 21.** Expressão de peptídeos antimicrobianos em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6, 24 e 48 horas após o tratamento com PBS, suspensão na concentração  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana* inativada pelo calor e *Beauveria bassiana*. (a) Ixodidina, (b) Drosomicina-like, (c) Defensina e (d) Microplusina. Foram dissecados 4 carrapatos/pool em três experimentos independentes e as amostras analisadas por qPCR.  $\beta$ -actina foi utilizada como normalizador. Os dados mostrados são média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0.05$ ; one-way ANOVA; teste de Tukey.

#### 4.8 Toll-Like em Carrapatos Tratados com *B. bassiana* 22

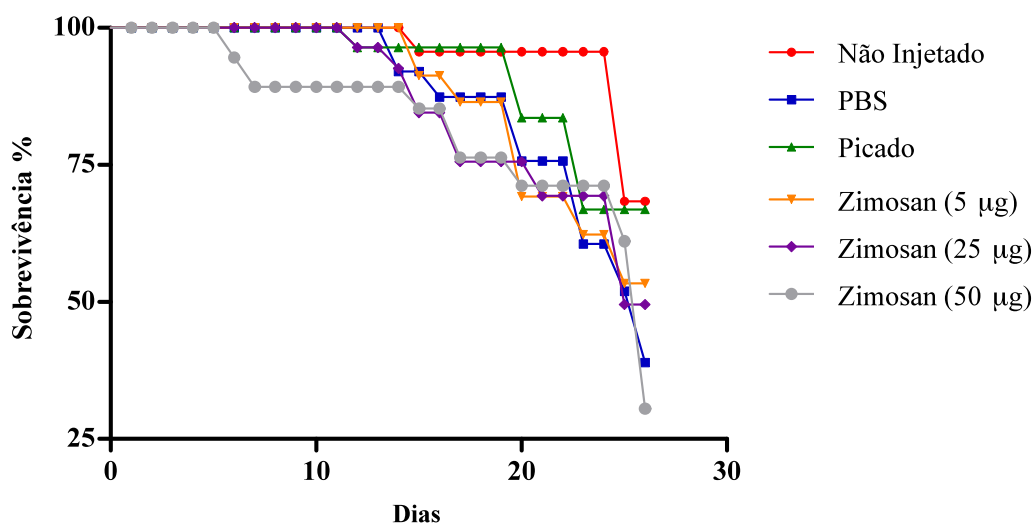
A expressão de receptores RmToll-like e RmToll8-like no corpo gorduroso das fêmeas completamente ingurgitadas de *R. (B.) microplus* 24 e 48 horas após os desafios com *B. bassiana* 22 foi determinada avaliando o nível de RNAm usando qPCR. Observamos um aumento significativo de 1,5 vezes no nível de RmToll-like 24 horas após o tratamento com PBS, *B. bassiana* inativada pelo calor, mas 48 horas após estes tratamentos ocorreu uma diminuição na expressão desse gene. Nos carrapatos desafiados com *B. bassiana* viável observamos um aumento significativo no nível de expressão de RmToll-like de aproximadamente 2 vezes maior do que a do grupo controle em 24 horas, após 48 horas observamos um aumento significativo de aproximadamente 1,5 vezes maior quando em relação à expressão aos não tratados (**Figura 22a**). Em relação ao gene RmToll8-like não houve diferença significativa na expressão nos tempos analisados (**Figura 22b**).



**Figura 22.** Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* desafiadas com *Beauveria bassiana* 22. Expressão dos genes RmToll-like (a) e RmToll8-like (b) por qPCR em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 24 e 48 horas após o tratamento com PBS, suspensão na concentração  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana* 22 inativada pelo calor e *Beauveria bassiana* 22. Foram dissecados 4 carrapatos/pool em.  $\beta$ - actina foi utilizada como normalizador. Os dados são mostrados  $\pm$  erro padrão. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; one-way ANOVA; teste de Tukey.

#### 4.9 Curva de Sobrevivência de Carrapatos Tratados com Zimosan

O percentual de sobrevivência das teleóginas foi observado diariamente, até o 25° dia após a realização dos tratamentos não injetado, apenas picado com a agulha, PBS e zimosan 5 $\mu$ g, 25 $\mu$ g e 50 $\mu$ g. Os resultados obtidos mostram que o tratamento com 50 $\mu$ g de zimosan aumentou a mortalidade mais precocemente (**Figura 23**).

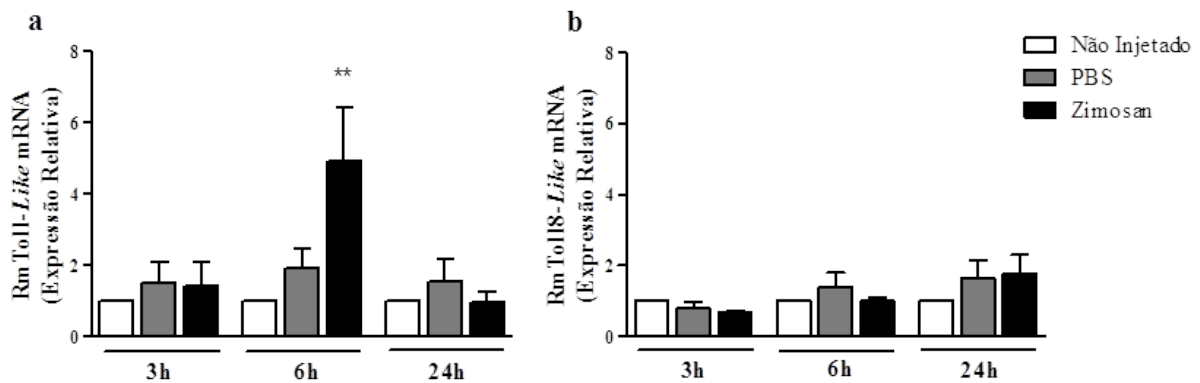


**Figura 23.** Efeito de diferentes tratamentos na sobrevivência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: (●) Não injetado; (■) PBS; (▲) picado; (▼) Zimosan 5µg; (◆) Zimosan 25µg; (◻) Zimosan 50µg. Foram usado 15 carrapatos por tratamento, observados durante 25 dias. Comparações com controles foram feitas usando o teste de análise Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. \*\*\* p < 0,001.

#### 4.10 Toll-Like em Carrapatos Tratados com Zimosan

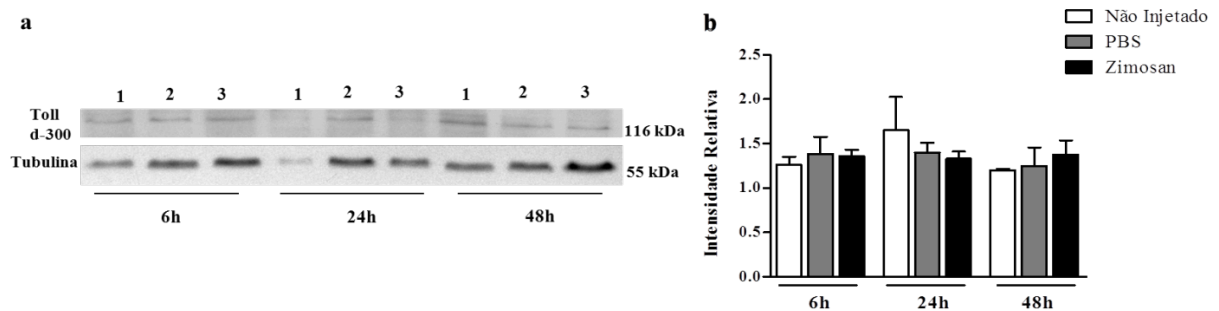
Apesar da curva de sobrevivência indicar que 50µg era mais nociva para o carrapato, nós escolhemos tratar com 5µg de zimosan corroborando com alguns experimentos encontrados na literatura para darmos continuidade as análises já que as outras quantidades poderiam configurar superdosagem de acordo com relatos da literatura.

A expressão de receptores *RmToll-like* e *RmToll8-like* no corpo gorduroso das fêmeas completamente ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, 3, 6 e 24 horas após os desafios com zimosan foi determinada avaliando o nível de RNAm usando qPCR. Em nosso estudo, mostramos que ocorreu um aumento significativo no nível de expressão de *RmToll-like* 6 horas após o tratamento zimosan sendo essa expressão de aproximadamente 5 vezes maior em relação ao controle não tratado. No tempo de 3 e 24 horas não observamos diferença na modulação desse gene quando comparado ao controle (**Figura 24a**). Em relação ao gene *RmToll8-like* não houve diferença significativa na expressão nos tempos analisados (**Figura 24b**).



**Figura 24.** Aumento da expressão de RmToll-like em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6 horas após o desafio com zimosan. Expressão dos genes RmToll-like (a) e RmToll8-like (b) por qPCR em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 3, 6 e 24 horas após o tratamento não injetado, PBS e Zimosan 5 µg. Foram dissecados 4 carrapatos/pool. β-actina foi utilizada como normalizador.

Analisamos também a presença da proteína Toll-like no corpo gorduroso por *western blot*, para isso nós escolhemos os tempos de 6, 24 e 48 horas após os tratamentos com 5µg de zimosan. Como apresentado na **figura 25** ocorreu a presença da proteína Toll-like neste tecido, mas, não foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos e em função do tempo de exposição analisados e a concentração de zimosan testada.



**Figura 25. (a)** *Western blot* em corpo gorduroso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 6, 24 e 48 horas após o tratamento: não injetado (1), PBS (2) e Zimosan 5 µg (3). 40 µg de proteína foram separados por 10% SDS-PAGE e eletrotransferidas para membrana de PVDF (Biorad). As membranas foram incubadas anticorpo primário policlonal, feito em coelho, anti-Toll (d-300) (Santa Cruz) na diluição 1:500, por uma noite a 4 °C. Em seguida incubadas com anticorpo secundário, anti-coelho conjugado a peroxidase na diluição 1:2.000. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com o substrato chemoluminescent (Pierce) durante 4 minutos à temperatura ambiente, e, em seguida, exposto a filme Bio Max light-1 (Kodak). **(b)** Os níveis de proteína Toll foram determinadas por análise densitométrica em computadores utilizando a função histograma de *Photoshop* e normalizados contra tubulina. Os resultados são expressos como média ± erro padrão. Comparações com controles foram feitos usando one-way ANOVA; teste de Tukey, \* p < 0.05.

## 5. DISCUSSÃO

A fim de identificar genes de *R. (B.) microplus* que codificam homólogos de receptores Toll, pesquisamos EST (*expressed sequences tag*) indexados de *R. (B.) microplus* no banco de dados disponível. Foram identificadas duas sequências de EST que correspondem a sequências parciais que codificam os domínios C-terminais de possíveis receptores Toll com elevada similaridade com as sequências utilizadas como sonda, denominadas *RmToll-like* e *RmToll8-like*. Tal pesquisa foi realizada em 2008, quando este trabalho foi iniciado.

Esforços feitos para conseguir recursos para sequenciar o genoma deste animal não foram bem sucedidos, apesar das tentativas. Tentando contornar este problema um grupo de cientistas estudiosos deste animal procuram atualizar o banco de dados já citado incorporando dados genômicos ao mesmo, mas o sucesso deste empreendimento foi muito limitado (BELLGARD et al, 2012).

Dentro deste cenário o grupo de cientistas ligados ao INCT-EM (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular) dedicado ao estudo do carrapato bovino decidiu que, para obter informações sobre genes que codificam proteínas deste organismo, seria mais eficiente analisar o transcriptoma de tecidos deste animal. Para tal foi extraído mRNA de glândula salivar, ovários, corpo gorduroso, singânglio, células digestivas de fêmeas teleógenas e separadamente de fêmeas partenógenas e embriões e este material foi utilizado para produzir bibliotecas de cDNA para sequenciamento.

Este material foi sequenciado e os resultados obtidos estão em avançada fase de análise, mas ainda não foram publicados. Como este ectoparasito ainda não teve seu genoma sequenciado, este tipo de estratégia nos permitiu obter informações mais completas sobre seus genes expressos.

A partir dos resultados deste sequenciamento foi montado um banco de dados consolidando as sequências expressas e este banco foi formatado de modo a permitir consultas através do uso do algoritmo Blast. Uma busca neste banco de dados utilizando as sequências previamente encontradas no TIGR *B. microplus* Gene Index nos levou a obter a sequência completa referente ao gene *RmToll-like*. Não achamos a sequência completa do gene *RmToll8-like*. Considerando que o material genético coletado para a obtenção do transcriptomas obtido por nós de *R. (B.) microplus* brasileiros não inclui larvas, ninfas nem animais resistentes a acaricidas, acreditamos que o gene *Rm-Toll8-like* não seja transcrito nos tecidos e/ou estágios de desenvolvimento escolhidos para o transcriptoma feito pelo INCT-EM.

Com o objetivo de verificar se as sequências por nós obtidas eram ortólogos de proteínas Toll ou *Toll-like* de outros organismos, alinhamos as sequências de proteínas de *R. (B.) microplus* com as sequências de proteínas Toll derivadas de genes de diferentes organismos. A árvore filogenética gerada a partir desse alinhamento mostrou que os isolados agruparam-se em três grandes grupos e que as duas sequências de interesse, *RmToll-like* e *RmToll8-like* de *R. (B.) microplus* se agruparam juntamente com os demais carrapatos, *R. s pulchellus* e *I. scapularis*, apresentando um bootstrap de 100 com o *Rhipicephalus pulchellus*, um carrapato do mesmo gênero.

Os receptores *Toll-like* (TLR) são proteínas transmembranares altamente conservadas que desempenham papel importante no reconhecimento de patógenos (KAWAI et al., 2010; ALBIGER et al., 2007). O reconhecimento de agentes patogênicos e a sinalização através de um mecanismo inato, que envolvem o domínio TIR, mostram-se presentes entre diversos organismos vertebrados e invertebrados (BARTON et al., 2009).

Devido ao interesse do nosso grupo de pesquisa no estudo do sistema imune inato do

carrapato *R. (B.) microplus*, investigamos a presença de receptores Toll-like nos principais órgãos envolvidos neste processo, como corpo gorduroso, célula digestiva e glândula salivar.

Utilizando a técnica de *western blot*, detectamos proteínas de pesos moleculares diferentes nas amostras analisadas, como, 126 kDa em embrião de *R. (B.) microplus*, provavelmente isoformas também envolvidas na formação do eixo dorso-ventral em *Drosophila* (GERTTULA; ANDERSON, 1988). Duas bandas de proteínas Toll de aproximadamente 116 kDa foram detectadas no corpo gorduroso, essas duas bandas podem representar proteínas Toll diferentes ou modificação pós-traducional de uma única proteína. Detectamos também proteínas de 116 kDa em glândula salivar e proteínas com peso molecular mais elevado de 141 kDa em célula digestiva.

Confirmamos a presença e a localização destas proteínas por microscopia confocal, e os resultados mostraram uma fluorescência positiva na glândula salivar e no corpo gorduroso. Em glândula salivar a marcação foi difusa no citoplasma ou concentrada nas vesículas intracelulares, apresentam uma marcação parcial com a marcação por fosfo-tirosina, sugerindo que estas podem representar vesículas endocíticas.

Os ácinos de glândulas salivares de *Ixodides* produzem uma infinidade de substâncias que neutralizam a homeostasia vertebrado-hospedeiro, inibição da agregação plaquetária, coagulação, promovendo a vasodilatação (FRANSCISCETTI et al., 2009). As glândulas salivares também são a principal via de transmissão de organismos patogênicos (NUNES et al., 2005), por estar sempre em contato com microorganismos e, portanto, aumentando a necessidade de um sistema imune ativo. Apesar de todas estas funções importantes, as glândulas salivares de carrapatos permanecem pouco estudadas no que diz respeito a sua morfologia e histologia, especialmente considerando o grande número de espécies de carrapatos.

Os resultados mostraram que a imunofluorescência de receptor Toll no corpo gorduroso é célula específica. De acordo com Coon et al. (1990), o corpo gorduroso de carrapatos, ao contrário dos insetos, é constituído por um único tipo de célula, os trofócitos. Por outro lado, Denardi et al. (2008), observaram a presença de dois tipos trofócitos em fêmeas parcialmente ingurgitadas de *A. cajennense*, que foram designados de trofócitos arredondados e trofócitos cubóides, devido às suas características morfológicas.

Podemos distinguir claramente esses dois tipos de células no corpo gorduroso de *R. (B.) microplus*, e somente as células semelhantes aos trofócitos arredondados foram imunomarcadas, esta marcação está distribuída na membrana plasmática, alguma marcação de Toll em trofócitos arredondados é restrita a vesículas intracelulares, parcialmente co-localizada com a marcação de fosfo-tirosina e ausente em trofócitos cuboidal.

A marcação que encontramos foi específica dos trofócitos arredondados indicando que a proteína Toll-like estava presente somente nesse tipo celular, sugerindo que estas células estão possivelmente envolvidas na resposta imune, já que a análise morfométrica mostrou que as áreas celulares e nucleares de trofócitos arredondados são maiores do que as dos trofócitos cubóides, estes estariam arrançados na forma de cordões, já os arredondados, os quais se encontram isolados e localizados em cima dos cordões de trofócitos cubóides, teriam conseqüentemente uma maior área de contato com a hemolinfa (DENARDI et al., 2008), conseqüentemente maior contato com agentes patogênicos invasores. As expressões de receptor Toll-like células específicas também indicam que os trofócitos arredondados e os trofócitos cubóides são efetivamente tipos de células diferentes do mesmo órgão. Estas populações celulares apresentam não só morfologia distinta, mas também funções distintas.

A utilização dos fungos entomopatogênicos vem se tornando uma alternativa promissora no controle de carrapatos de importância médica e médica veterinária. Várias espécies de fungos entomopatogênicos são conhecidas por causar mortalidade em diferentes

estágios de desenvolvimento de carrapatos (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008). Como mostramos na curva de sobrevivência a *B. bassiana* é patogênica para o carrapato confirmando outros estudos encontrados na literatura (BITTENCOURT et al., 1997; PERINOTTO et al., 2012).

Recentemente há um grande avanço no entendimento da resposta imune de artrópodes, principalmente dos insetos, cujo modelo mais estudado é o díptero *D. melanogaster*. No entanto, a resposta imune de carrapatos é pouco compreendida, principalmente após a infecção com fungos entomopatogênicos.

Por esta razão analisamos a expressão de receptores *RmToll-like* e *RmToll8-like* no corpo gorduroso das fêmeas completamente ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, 6, 24 e 48 horas após os desafios com *B. bassiana* 986. Observamos um aumento no nível de *RmToll-like* 6 horas após o tratamento com PBS, *B. bassiana* inativada pelo calor e *B. bassiana*, sugerindo uma resposta rápida a possíveis lesões externas causadas pela injúria. Após 24 horas os níveis de expressão foram baixos em todos os tratamentos e no grupo não tratado. Nós mostramos que a transcrição de *RmToll-like* foi elevada no corpo gorduroso 48 horas após o desafio com *B. bassiana*, mostrando um aumento significativo no nível de expressão, de aproximadamente 4,5 vezes quando comparadas ao grupo controle. Em relação ao gene *RmToll8-like* não houve diferença na expressão entre os tratamentos e em função do tempo de exposição ao fungo. Estes resultados mostram que *R. (B.) microplus* expressa *RmToll-like* quando desafiados imunologicamente, sugerindo que a sua participação é mais relevante na resposta imune inata contra o fungo que *RmToll8-like*.

Quando fomos analisar uma cepa menos virulenta como a *B. bassiana* 22 (FERNANDES et al, 2006), observamos um aumento significativo de 1,5 vezes no nível de *RmToll-like* 24 horas após o tratamento com PBS, *B. bassiana* inativada pelo calor, 48 horas após estes tratamentos ocorreu uma diminuição na expressão desse gene, sugerindo uma resposta rápida a possíveis lesões externas causadas pela injúria.

Nos carrapatos desafiados com *B. bassiana* viável observamos um aumento significativo no nível de expressão de *RmToll-like* de aproximadamente 2 vezes maior do que a do grupo controle em 24 horas, após 48 horas observamos um aumento significativo de aproximadamente 1,5 vezes maior quando em relação à expressão nos tecidos não tratados, mostrando que uma cepa menos virulenta gera uma menor expressão do gene quando comparada a cepa mais virulenta *B. bassiana* 986 que teve a expressão aumentada 4,5 vezes em relação as amostras não desafiadas. Para o gene *RmToll8-like* não observamos diferença significativa na expressão nos tempos analisados.

Entretanto, quando fomos avaliar a expressão da proteína nos carrapatos desafiados com *B. bassiana* 986, tanto por *western blot* quanto por microscopia confocal, não observamos diferença entre os tratamentos nos tempos analisados. Possivelmente porque a proteína reconhecida pelo anticorpo utilizado não seja a mesma do gene que encontramos modulado pelo desafio nas análises de qPCR.

A modulação da expressão de genes dos PAM expostas a diferentes desafios sugere a existência de mecanismos distintos de reconhecimento e ativação da expressão gênica desses peptídeos em carrapatos, como já descrito para *D. melanogaster* (HOFFMANN e REICHHART, 2002). Nesse díptero, a indução da expressão gênica dos PAM é regulada por duas vias de sinalização intracelular: a via *Toll* e a via *Imd*, que são ativadas de acordo com o desafio microbiano. As infecções causadas por fungos e bactérias Gram-positivas estimulam a via *Toll*, e culminam na indução da expressão das drosomicinas, metchnikovinas e defensinas. Já as infecções por bactérias Gram-negativas estimulam a via *Imd*, culminando na indução da expressão dos genes das atacinas, cecropinas, dipterocinas e drosocinas (HOFFMANN e REICHHART, 2002).



Os testados neste trabalho foram a microplusina (FOGACA et al., 2004), defensina (FOGACA et al., 2004; ESTEVES et al., 2009), ixodidina (FOGACA et al., 2004) e drosomicina-like. Verificamos que a expressão do gene da ixodidina aumentou no corpo gorduroso 6 horas após o tratamento com *B. bassiana*, embora não haja um aumento estatisticamente significativo. Observamos uma diminuição da expressão deste gene em 24 e 48 horas após o estímulo com *B. bassiana* em relação à expressão nos tecidos não tratados.

O gene da drosomicina-like, não apresentou aumento significativo da expressão após o tratamento com *B. bassiana* nos tempos analisados. Observamos uma diminuição da expressão desse gene 24 horas após o tratamento com *B. bassiana* inativa seguida de uma modulação positiva 48 horas após o tratamento.

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

A expressão do gene da defensina foi inibida significativamente 6, 24 e 48 horas após o tratamento com *B. bassiana* inativada. O mesmo foi observado para o tratamento com *B. bassiana*, onde ocorreu uma inibição da expressão desse gene 6 e 24 horas após o tratamento seguida de um aumento na expressão após 48 horas.

Dados da literatura têm mostrado que em carrapatos a expressão gênica dos AMPs é modulada após o desafio com patógenos naturais. Em carrapatos *D. variabilis*, que é vetor natural da bactéria *Rickettsia montanensis*, foi observado um aumento da expressão gênica de duas isoformas da defensina (1 e 2) e da lisozima no corpo gorduroso e no intestino após o desafio com a riquetsia (CERAUL et al., 2007).

No carrapato *D. variabilis* foi demonstrada a indução de peptídeos defensina-like no intestino de carrapatos infectados com *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Borrelia burgdorferi* (SONENSHINE et al., 2002). Não somente no intestino, mas também nos hemócitos de *D. variabilis* foi identificada a expressão de uma defensina. Os autores sugerem que o peptídeo é armazenado nos hemócitos e liberado para hemolinfa após infecção (CERAUL et al., 2003). O peptídeo apresentou atividade antimicrobiana contra várias cepas de bactérias Gram-positivas e de fungos (FOGACA et al., 1999), causando permeabilização da membrana de *Micrococcus luteus* (SFORCA et al., 2005) e *Candida albicans* (MACHADO et al., 2007).

A expressão do gene da microplusina foi inibida 6 e 24 horas após o tratamento com *B. bassiana* inativada seguida de um aumento na expressão 48 horas após o tratamento. A expressão do gene da microplusina aumentou no corpo gorduroso 6 horas após o tratamento com *B. bassiana*, seguida da diminuição da expressão deste gene em 24 e 48 horas após o estímulo em relação à expressão nos tecidos não tratados. Essa diminuição seguida do aumento da expressão pode ser uma subversão dos mecanismos de defesa do carrapato para que o fungo possa se estabelecer, cepa menos virulentas poderiam não se estabelecer tão bem por não promover essa imunossupressão.

A expressão gênica constitutiva da microplusina foi detectada nos hemócitos, corpo gorduroso, ovários e ovos do carrapato *R. (B.) microplus*, mas os principais sítios de expressão gênica da defensina são os hemócitos e o corpo gorduroso (FOGACA et al., 2004,

ESTEVEES *et al.*, 2009). A microplusina também é ativa contra várias cepas de bactérias Gram-positivas e de fungos, porém não apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas.

Organismos invasores são reconhecidos pelos artrópodes através de receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors* - PRR) que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns* -PAMP) (MEDZHITOV; JANEWAY, 2002).

Dentre os PRR, a maior família de receptores são os TLR (ADEREM; UNDERHILL, 1999; OZINSKY *et al.*, 2000; KAWAI; AKIRA, 2005). Em alguns casos, os TLR podem formar dímeros para reconhecimento de certos elementos em comum, como visto no caso do zimosan, uma partícula presente em fungos, e que pode ser reconhecida pelo dímero TLR 2/6 além de individualmente por cada um destes receptores (AKIRA *et al.*, 2004; IKEDA *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2009).

O reconhecimento através dos TLR permite uma identificação do patógeno que está causando a infecção e o desencadeamento de cascatas de sinalização intracelular que permite a amplificação do sinal e eficiente resposta inespecífica, capaz de combater uma infecção por praticamente qualquer patógeno apenas através do reconhecimento dos PAMP que estes apresentam (ADEREM; UNDERHILL, 1999; OZINSKY *et al.*, 2000).

Neste trabalho o PAMP estudado foi o zimosan, que consiste de uma cadeia com repetição de glicose ligadas por unidades de ligações  $\beta$ -1,3-glicosídicas. O zimosan é um ligante presente na parede celular de fungos, como leveduras, e utilizado para induzir a inflamação experimental.

Então fomos avaliar o percentual de sobrevivência de teleóginas por o 25 dias após a realização dos tratamentos não injetado, picado, PBS e zimosan 5 $\mu$ g, 25 $\mu$ g e 50 $\mu$ g. Os resultados obtidos mostram que o tratamento com 50 $\mu$ g de zimosan eleva a taxa de mortalidade mais precocemente.

A curva de sobrevivência indica que o tratamento com 50 $\mu$ g foi mais letal para o carrapato, ocasionando uma mortalidade mais precoce, entretanto nós escolhemos o tratamento de 5 $\mu$ g de zimosan de acordo com alguns experimentos encontrados na literatura, para darmos continuidade as análises pois as quantidades utilizadas nos outros tratamentos poderiam configurar superdosagem.

Conseguimos mostrar que a expressão de receptores *RmToll-like* e *RmToll8-like* no corpo gorduroso das fêmeas completamente ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, 3, 6 e 24 horas após os desafios com zimosan foi determinada avaliando o nível de RNAm usando qPCR. Em nosso estudo, mostramos que ocorreu um aumento significativo no nível de expressão de *RmToll-like* 6 horas após o tratamento zimosan sendo essa expressão de aproximadamente 5 vezes maior em relação ao controle não tratado. No tempo de 3 horas e 24 horas não observamos diferença na modulação desse gene quando comparado ao controle. Em relação ao gene *RmToll8-like* não houve diferença significativa na expressão nos tempos analisados.

Analisamos também a presença da proteína *Toll-like* no corpo gorduroso após desafio com zimosan por *western blot*, mas não foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos e em função do tempo de exposição analisados e a concentração de zimosan testada. Possivelmente porque a proteína reconhecida pelo anticorpo utilizado não seja a mesma do gene que encontramos modulado pelo desafio nas análises de qPCR.

O presente trabalho mostra a presença de receptores *Toll-like* em *R. (B.) microplus* e sugere a existência de diferentes isoformas destes receptores específicos para cada tipo celular estudado. Isto está de acordo com a conclusão de que apesar de uma enorme variação de isoformas de TLR existentes o sistema imunológico inato demonstra alto grau de homologia entre mamíferos, insetos e plantas e, aparentemente, têm sido altamente preservados durante a evolução (ISHII *et al.*, 2008).

## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostra a presença de receptores *Toll-like* em carrapato.

Mostramos a existência de proteínas destes receptores com diferentes pesos moleculares específicos para cada tipo celular estudado. E uma marcação célula específica para corpo gorduroso.

A expressão de gene *RmToll-like* foi modulada pelos desafios aos quais o carrapato foi submetido. Entretanto não houve modulação da expressão do gene *RmToll8-like* nos tempos analisados. Sugerimos que novos estudos devam ser realizados utilizando tempos distintos, e com intensidades distintas de desafios imunológicos das que foram avaliadas neste trabalho.

Concluimos que este trabalho demonstra a expressão de receptores *Toll-like* em carrapatos, relata a expressão diferencial entre diferentes tecidos engajados na resposta imune inata e a modulação por desafios imunológicos neste artrópode.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 17, p. 593-623, 1999.
- AGAISSE, H.; PETERSEN, U.M.; BOUTROS, M.; MATHEY-PREVOT, B.; PERRIMON, N. Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. **Developmental Cell**, v. 5, p. 441-50, 2003.
- AKIRA, S. Toll receptor families: structure and function. **Seminars in Immunology**, v. 16, p. 1-2, 2004.
- ALBIGER, B.; DAHLBERG, S.; HENRIQUES-NORMARK, B.; NORMARK, S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 6, p. 511-28, 2007.
- ALMEIDA, M.B.; TORTELLI, F.P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J.L.M.; SOARES, M.P.; FARIAS, N.A.R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. Tristeza parasitária bovina na região Sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 237-242, 2006.
- ALONSO-DÍAZ, M.A.; GARCIA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ANGEL-SAHAGÚN, C.A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 336-340, 2007.
- ALVES, S. B.; LECUONA, R. E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano In: **Controle microbiano de insetos**. 2a ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. p. 97-170.
- ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2a ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K.C.; SASAKI, S.D.; SAMPAIO, C.A.; TANAKA, A.S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 557-563, 2002.
- ANGELO, I.C.; FERNANDES, E.K.K.; BAHIENSE, T.C.; PERINOTTO, W.M.S.; MORAES, A.P.R.; TERRA, A.L.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 317- 322, 2010.
- ARANCIBIA, S.A.; BELTRÁN, C.J.; AGUIRRE, I.M.; SILVA, P.; PERALTA, A.L.; MALINARICH, F.; HERMOSO, M.A. Toll-like Receptors are key participants in innate immune responses. **Biological Research**, v. 40, n. 2, p. 97-112, 2007.
- ARBOUZOVA, N.; ZEIDLER, M.P. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. **Development**, v. 133, n. 14, p. 2605-16, 2006.
- ASHIDA, M.; BREY, P. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In **Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects**. Brey, P.T., and Hultmark, D. (eds). London, UK: Chapman and Hall, 1998, p. 135-172.
- ATHAYDE, A. C. R.; FERREIRA, U. L.; LIMA, E. A. L. A. Fungos entomopatogênicos. **Biociência e desenvolvimento**, ano 4, n. 21, p. 12- 15, 2001.
- BAHIENSE, T. C. **Avaliação in vitro dos fungos Entomopatogênicos Metarhizium anisopliae e Beauveria bassiana Associados ou não com Deltametrina no controle de uma cepa do carrapato**

**boophilus microplus Resistente a Piretróides.** 2007. 54p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

BACIENSE, T. C.; FERNANDES, É. K. K.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S. and BITTENCOURT, V. R. E. P. Performance of *Metarhizium anisopliae* and its combination with deltamethrin against a pyrethroid-resistant strain of *Boophilus microplus* in a stall test. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, p. 242-245, 2008.

BACIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 319-324, 2006.

BALASHOV YU.S.; DAÏTER, A.B. Apropos of the role of ticks from the Ixodoidea superfamily in Q fever. V. Localization and dissemination of *Rickettsia burnetii* in the organism of *Hyalomma asiaticum* P. Sch. et E. Schl. ticks. **Tr Leningr Inst Epidemiol Mikrobiol**, v. 25, p. 135-53, 1963.

BARCI, L.A.G. Controle biológico do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) no Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 64, n. 1, p. 95-101, 1997.

BARCI, L.A.G.; ALMEIDA, J.E.M.; NOGUEIRA, A.H.C.; ZAPPELINI, L.O.; PRADO, A.P.; Selection of isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinaria**, v. 18, p. 7-13, 2009.

BARILLAS-MURY, C.; HAN, Y.S.; SEELEY, D.; KAFATOS, F.C. *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. **The EMBO Journal**, v. 15;18, n. 4, p. 959-67, 1999.

BARRÉ, N.; LI, A.Y.; MILLER, R.J.; GAÏA, H.; DELATHIÈRE, J.M.; DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E. In vitro and in vivo evaluation of deltamethrin and amitraz mixtures for the control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) in New Caledonia. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p.110-9, 2008.

BARRIGA, O.O. Evidence and mechanisms of immunosuppression in tick infestations. **Genetic Analysis**, v. 15, n. 3-5, p. 139-42, 1999.

BARTON, G.M.; KAGAN, J.C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 8, p. 535-42, 2009.

BEENAKKERS, A. M. TH.; VAN DER HORST, D. J.; VAN MARREWIJK, W. J. A. Biochemical processes directed to flight muscle metabolism. In **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology** (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. I.), Pergamon Press, Oxford. 1984, vol. 10, cap. 11.

BELLEGARD, M.I.; MOOLHUIJZEN, P.M.; GUERRERO, F.D.; SCHIBECI, D.; RODRIGUEZ-VALLE, M.; PETERSON, D.G.; et al. CattleTickBase: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Int J Parasitol**, v. 42, n. 2, p.161-169, 2012.

BELVIN, M.P.; ANDERSON, K.V. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 393-416, 1996.

BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, n. 1, p. 52-61, 1974 a.

BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. **Acarologia**, v. 16, n. 2, p. 251-7, 1974 b

- BEUGNET, F.; CHARDONNET, L. Tick resistance to pyrethroids in New Caledonia. **Veterinary Parasitology**, v.56, p. 325-338, 1995.
- BINNINGTON, K. C.; OBENCHAIN, F. D. Structure and function of the circulatory, nervous, and neuroendocrine systems of ticks. In: OBENCHAIN, F. G.; GALUN, R. **Physiology of ticks**. 1. ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. cap. 10, p. 351-398.
- BITTENCOURT, V. R. E. P. ; MASSARD, C. L. ; MASSARD, C. A. . Aspectos epidemiológicos da babesiose equina na microrregião Fluminense do Grande Rio - Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, RJ, v. 4, n.1, p. 13-17, 1997.
- BITTENCOURT, V. R. E. P. ; MASCARENHAS, A. G. ; MENEZES, G. C. R. ; MONTEIRO, S. G. . Ação in vitro do METARHIZIUM ANISOPLIAE (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e BEAUVERIA BASSIANA (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre ovos do carrapato ANOCENTOR NITENS (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, RJ, v. 22, n.6, p. 248-251, 2000.
- BITTENCOURT, V. R. E. P., SOUZA, E. J, COSTA, G. L. Evaluation of a formulation of Beauveria bassiana for control of Anocentor nitens. **Abstracts of the IV international conference on ticks and tick-born pathogens**. Banff, Canada, 2002, p. 88.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Ação do fungo Metarhizium anisopliae (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, em ovos e larvas do carrapato Boophilus microplus (Canestrini, 1887). **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 16, p. 32-38, 1994 a.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A. F. Uso do fungo Metarhizium anisopliae (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato Boophilus microplus (Canestrini, 1887). **Arquivo da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, v.15, n.2, p.197- 202, 1992.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S. L. F. S.; VIEGAS, E. C.; ALVES, S. B. Avaliação dos efeitos do contato de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de Boophilus microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, p. 81-84, 1996.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; BAHIANSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K. Avaliação da ação in vivo de Metarhizium anisopliae (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre Brachiaria decumbens infestada com larvas de Boophilus microplus (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, p. 38-42, 2003.
- BOUTROS, M.; AGAISSE, H.; PERRIMON, N. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. **Developmental Cell**, v. 3, n. 5, p.711-22, 2002.
- BOWIE, A.G. Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 147, n. 2, p.217-26, 2007.
- BRITO, L.G. Carrapatograma: um aliado do produtor na exploração leiteira, 2008. Disponível em <http://www.agrosoft.org.br/pdf.php/node=103589>. Acesso em 27 de novembro de 2012.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.3, p.238-50, 2005.
- BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental Comparative Immunology**, v. 23, n. 4-5, p. 329-344, 1999.
- BULET, P.; STOCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 3-11, 2005.

BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v.198, p.169-84, 2004.

CAGAN, L.; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet Light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**, Konossu Saitama, v.2, n.4, 2001

CERAUL, S. M.; SONENSHINE, D. E.; RATZLAFF, R. E.; HYNES, W. L. An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Insect biochemistry and insect molecular biology**, v.33, n.11, p.1099-103, 2003.

CERENIUS, L.; LEE, B.L.; SODERHALL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in Immunology**, v. 29, p. 263-71, 2008.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 116-126, 2004.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of acari. **Biocontrol Science and Technology**, v.10, p.357-384, 2000.

CHRISTENSEN, B.M.; LI, J.; CHEN, C.C.; NAPPI, A.J. Melanization immune responses in mosquito vectors. **Trends Parasitology**, v. 21, n. 4, p. 192-9, 2005.

CHRISTOPHIDES, G.K.; ZDOBNOV, E.; BARILLAS-MURY, C.; BIRNEY, E.; BLANDIN, S.; BLASS, C.; BREY, P.T.; COLLINS, F.H.; DANIELLI, A.; DIMOPOULOS, G.; HETRU, C.; HOA, N.T.; HOFFMANN, J.A.; KANZOK, S.M.; LETUNIC, I.; LEVASHINA, E.A.; LOUKERIS, T.G.; LYCETT, G.; MEISTER, S.; MICHEL, K.; MOITA, L.F.; MÜLLER, H.M.; OSTA, M.A.; PASKEWITZ, S.M.; REICHHART, J.M.; RZHETSKY, A.; TROXLER, L.; VERNICK, K.D.; VLACHOU, D.; VOLZ, J.; VON MERING, C.; XU, J.; ZHENG, L.; BORK, P.; KAFATOS, F.C. Immunity- related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 4, p. 298(5591):159-65, 2002.

CITELLI, M.; LARA, F.A.; VAZ JR, I. S.; OLIVEIRA, P. L. Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 151, p. 81-88, 2007.

COLLINS, W.E.; SULLIVAN, J.S.; NACE, D.; WILLIAMS, T.; SULLIVAN, J.J.; GALLAND, G.G.; GRADY, K.K.; BOUNNGASENG, A. Experimental infection of *Anopheles farauti* with different species of *Plasmodium*. **The Journal of Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 295-8, 2002.

COONS, L.B., L'AMOREAUX, W.J., ROSELL-DAVIS, R. & STARR-SPIRES, L. Fine structure of the fat body and nephrocytes in the life-stages of *Dermacentor variabilis*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 8, n. 1-2, p. 125-42, 1990.

CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle ou erradicação**. Alegrete: Gralha, 1996.

CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle ou erradicação**. Guaíba: Agropecuária, 1997. 176p.

CROZATIER, M. Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. **Nature**, v. 15, n. 446(7133), p. 325-8, 2007.

DA SILVA VAZ JR, I.; LOGULLO, C.; SORGINE, M.; VELLOSO, F.F.; ROSA DE LIMA, M.F.; GONZALES, J.C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L.; MASUDA, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 66, p. 331-341, 1998.

DA SILVA VAZ JR, I.; MARTINEZ, R.H.; OLIVEIRA, A.; HECK, A.; LOGULLO, C.; GONZALES, J.C.; DEWES, H.; MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulin's in *Boophilus microplus* hemolymph.

**Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 155-160, 1996.

DA SILVA VAZ JR, I.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P. Vacina contra o carrapato. **Biociência Ciência e Desenvolvimento**, p. 18-22, 2002.

DANNHORN, D.R.; K.A. SEITZ. Hemocytes of *Leiobunum limbatum* and two other species of harvestmen (Aracnida, Opiliones): Morphological classification and functional aspects. **The Journal of Morphology**, v. 193, p. 185-196, 1987.

DAVEY, M.R.; KOTHARI, S.L.; ZHANG, H.; RECH, E.L.; COCKING, E.C.; LYNCH, P.T. Transgenic rice: Characterization of protoplast-derived plants and their seed progeny. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 1159-1169, 1991.

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

DE GREGORIO, E.; SPELLMAN, P.T.; RUBIN, G.M.; LEMAITRE, B. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 23;98(22), p. 12590-5, 2001.

DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; PÉREZ DE LA LASTRA, J.M.; KOCAN, K. M.; WILLADSEN, P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 1, p. 23-8, 2007.

DE LA FUENTE, J.; RODRÍGUEZ, M.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; GARCÍA- GARCÍA, J.C.; MÉNDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDÉS, M.; ENRÍQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUÉ, O.; MACHADO, H.; LLEONART, R. Vaccination Against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genetic Analysis**, v. 15, n. 3-5, p. 143-8, 1999.

DE LA FUENTE, J.; RODRÍGUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; GARCIA- GARCIA, J. C.; MÉNDEZ, L.; SERRANA, E. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac™ against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v.16, p.366-373, 1988.

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

DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; OLIVEIRA, P.R.; NUNES, E.T.; SAITO, K.C.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.125, p.379-395, 2004.

DONG, Y.; DIMOPOULOS, G. *Anopheles* fibrinogen-related proteins provide expanded pattern recognition capacity against bacteria and malaria parasites. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 15, p. 9835-44, 2009.

DOSTERT, C.; JOUANGUY, E.; IRVING, P.; TROXLER, L.; GALIANA-ARNOUX, D.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A.; IMLER, J.L. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. **Nature Immunology**, v. 6, n. 9, p. 946-53, 2005.

DUPUIS, S.; JOUANGUY, E.; AL-HAJJAR, S.; FIESCHI, C.; AL-MOHSEN, I.Z.; AL-JUMAAH, S.; YANG, K.; CHAPGIER, A.; EIDENSCHENK, C.; EID, P.; AL GHONAIUM, A.; TUFENKEJI, H.; FRAYHA, H.; AL-GAZLAN, S.; AL-RAYES, H.; SCHREIBER, R.D.; GRESSER, I.; CASANOVA, J.L. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3, p. 388-39, 2001.



- EGGENBERGER, L. R.; LAMOREAUX, W. J.; COONS, L. S. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 9, p. 279-287, 1990.
- ESTEVEES, E.; FOGACA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F. D.; MANSO, P. P.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, n.8, p.913-9, 2009.
- ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATTOR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 38, p. 219-235, 2006.
- EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A Review of the ticks (Acari, ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.4, p.453-70. 2000.
- FARGUES, J.; GOETEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia**, v.135, p.171-181, 1996.
- FEHLBAUM, P.; BULET, P.; MICHAUT, L.; LAGUEUX, M.; BROEKAERT, W.F.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.A. Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 52, p. 33159-63, 1994.
- FERNANDES, E. K. K.; COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L.; ZAHNER, V.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**, Berlin, v. 98, n. 4, p. 324-332, 2006.
- FERNANDES, E. K. K. **Caracterização e seleção de isolados de Beauveria bassiana para o controle microbiano do carrapato Boophilus microplus**. 2007.150p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v.46. p.71-93, 2008.
- FERNANDES, É. K. K.; ANGELO, I. C.; RANGEL, D. E. N.; BAHIENSE, T. C.; MORAES, Á. M. L.; ROBERTS, D. W.; BITTENCOURT, V. R. E. P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology** (Print), v. 182, p. 307-318, 2011.
- FOGACA, A. C.; DA SILVA, P. I.; JR., MIRANDA, M. T.; BIANCHI, A. G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P. E.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.36, p.25330-4, 1999.
- FOGACA, A. C.; ALMEIDA, I. C.; EBERLIN, M. N.; TANAKA, A. S.; BULET, P.; DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, v.27, n.4, p.667-74, 2006.
- FOGACA, A. C.; LORENZINI, D. M.; KAKU, L. M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental and Comparative Immunology**, v.28, n.3, p.191-200, 2004.

- FREIRE, J. J. Arseno e cloro resistência e emprego de tiofosfato de dietilparanitrofenila (Parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Boletim da Diretoria de Produção Animal**, v.9 , p. 3-21, 1953.
- FREIRE, J. J. Carrapato resistente a banheações carrapaticidas no Rio Grande do Sul. **Bol. Dir. Prod. Anim.**, v.13, p.62-80, 1956.
- FREITAS, D. R. J.; POHL, P. C.; VAZ, I. S. J. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 109-117, 2005.
- FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola Veterinária UFMG**, n.8, p.49-61, 1993.
- FURLONG, J.; MARTINS, J. R. ; PRATA, M. C. A. CONTROLE ESTRATÉGICO DO CARRAPATO DOS BOVINOS. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, RS, v. 23, n.137, p. 53-56, 2004.
- FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Circular Técnica n. 59-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 2000. 25p.
- GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1513-1518, 2004.
- GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J.; PRETTE, N.; BECHARA, G. H. Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, n.4, p.368- 372, 2005.
- GARVER, L.S.; DONG, Y.; DIMOPOULOS, G. Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 3, 2009.
- GERTTULA, S., YISHI, J. AND ANDERSON. K.V. Zygotic expression and activity of the *Drosophila* Toll gene, a gene required maternally for embryonic dorsal-ventral pattern formation. **Genetics**, v. 119, p. 123–133, 1988.
- GILBERT, L.I.; CHINO, H. Transport of lipids in insects. **Journal of Lipid Research**, v.15, p.439-456, 1974.
- GILLESPIE, J.P.; KANOST, M.R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review Entomology**, v.42, p.611-642, 1997.
- GOBERT, S.; KYRAMARIOS, M.; LEPOINT, G.; PERGENT-MARTINI, C.; BOUQUEGNEAU, J.M.) Variations a` diferentes e`chelles spatiales de l`herbier a` *Posidonia oceanica* (L.) Delile; effect sur les parametres physico-chimiques du sediment. **Oceanologica Acta**, v, 26, p. 199–207, 2003.
- GOETTEL, M. S.; INGLIS, G. D.; WRAIGHT, S. P. Fungi. In: **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 2000, cap.4, p.255- 282, 2000.
- GONZALES, J. C.; SERRA-FREIRE, N. M. O couro dos bovinos no Rio Grande do Sul: riqueza há muito maltratada. **A Hora Veterinária**, 12(69):14-6, 1992.
- GONZALES, J.C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 101p.
- GONZÁLES, J.C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Can. 1887) (Revisão histórica e conceitual). **A Hora Veterinária**, ano 21, n.125, p.23-28, 2002

- GOTTAR, M.; GOBERT, V.; MATSKEVICH, A.A.; REICHHART, J.M.; WANG, C.; BUTT, T.M.; BELVIN, M.; HOFFMANN, J.A.; FERRANDON, D. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. **Cell**, v. 29, n. 127(7), p. 1425-37, 2006.
- GOUMON, Y.; STRUB, J. M.; MONIATTE, M.; NULLANS, G.; POTEUR, L.; HUBERT, P.; VAN DORSSELAER, A.; AUNIS, D.; METZ-BOUTIGUE, M. H. The Cterminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. **European Journal of Biochemistry**, v.235, n.3, p.516-25, 1996.
- GRAF, J. F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH, BING N.; SABATINI, S. A.; MOLENTO, M. B.; BORDIN, E. L.; ARANTES, G.J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v. 129, p. 427- 442, 2004
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; BORJA, G.E.M.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, ano 21, n.125, p.23-28, 2002.
- GUERRERO, F. D.; NENE, V. M.; GEORGE, J. E.; BARKER, S. C.; WILLADSEN, P. Sequencing a new target genome: the *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) genome project. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 1, p. 9-16, 2006.
- GUPTA, L.; KUMAR, S.; HAN, Y.S.; PIMENTA, P.F.; BARILLAS-MURY, C. Midgut epithelial responses of different mosquito-Plasmodium combinations: the actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 15, n. 102(11), p. 4010-5, 2005.
- HA, E.M.; OH, C.T.; RYU, J.H.; BAE, Y.S.; KANG, S.W.; JANG, I.H.; BREY, P.T.; LEE, W.J. An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. **Developmental Cell**, v, 8, n. 1, p. 125-32, 2005 a.
- HANCOCK, R.E.; SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551-7, 2006.
- HANCOCK, R.E.; SCOTT, M.G. . The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 1, n. 97(16), p. 8856-61, 2000.
- HANRATTY, W.P.; DEAROLF, C.R. The *Drosophila* Tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. **Molecular and General Genetics**, v. 238, n. 1- 2, p. 33-7, 1993.
- HARRISON, D.A.; BINARI, R.; NAHREINI, T.S.; GILMAN, M.; PERRIMON, N. Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 14(12), p. 2857-65, 1995.
- HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. ( Ainsworth and Bisby's) **Dictionary of the Fungi**, 8aed. , CAB International, Wallingford, UK, 1995. 616p.
- HAWKSWORTH, D.L. **Micologist's handbook**. 2aed. England, Kew Surrey: CAB Press, 1977. 231p
- HILLYER, J.F. Transcription in mosquito hemocytes in response to pathogen exposure. **Journal of Biology**, v. 8, n. 5, p. 51, 2009.
- HO, L.J.; HUNG, L.F.; WENG, C.Y.; WU, W.L.; CHOU, P.; LIN, Y.L.; CHANG, D.M.; TAI, T.Y.; LAI, J.H. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. **The Journal of Immunology**, v. 15, n.174(12), p. 8163-72, 2005.
- HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. **Nature Immunology**, v.3, n.2, p.121-6, 2002.

- HOFFMANN, J. A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, v. 426, p. 33-38, 2003.
- HOOGSTRAAL, H.; WASSEF, H.Y. Dermacentor (Indocentor) atrosignatus (Acari: Ixodoidea: Ixodidae): hosts and distribution in the Malay Peninsula, Indonesia, Borneo, and southern Philippines. **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 22(6), p. 644-7, 1985.
- HORN, S. C. **Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos no Brasil**. Boletim de Defesa Sanitária Animal, 1983. 15p.
- HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.4, p.12-32, 1985.
- HULTMARK, D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 1, p. 12-9, 2003.
- HUME, J.C.; TUNNICLIFF, M.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.C.; DAY, K.P. Susceptibility of *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* to tropical isolates of *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**, v. 24, n.6, p.139, 2007.
- IKEDA, Y.; ADACHI, Y.; ISHII, T.; MIURA, N.; TAMURA, H.; OHNO, N. Dissociation of Toll-like receptor 2-mediated innate immune response to Zymosan by organic solvent-treatment without loss of Dectin-1 reactivity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 1, p. 13-8, 2008.
- IMLER, J.L.; ZHENG, L. Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n.1, p. 18-26, 2004.
- INOUE, N.; HANADA, K.; TSUJI, N.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 4, n. 38, p. 514-519, 2001.
- ISHII, K.J.; KOYAMA, S.; NAKAGAWA, A.; COBAN, C.; AKIRA, S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. **Cell**, v. 3, n. 6, p. 352-63, 2008.
- IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **J. Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, n.2, p.128-50, 2005.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v, 129, n. S3- 14, 2004.
- JONSSON, N. N. Control of cattle ticks (*Boophilus microplus*) on Queensland dairy farms. **The Australian Veterinary Journal**, v.75, p. 802-807, 1997.
- JONSSON, N. N. The productivity effects of the cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v, 137, n. 1-10, 2006.
- JONSSON, N. N.; HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v, 146, n. (3-4), p. 193-8, 2007.
- KARST, S.M.; WOBUS, C.E.; LAY, M.; DAVIDSON, J.; VIRGIN, H.W.; STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. **Science**, v. 299, n. 5612, p. 1575-8, 2003.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 4, p. 338-44, 2005.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373-84, 2010.

KEELEY, L.L.; MCKERCHER, S.R. Endocrine regulations of ovarian maturation in the cockroach *Blaberus discoidalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology, A: Comparative Physiology**, v. 80, n. 1, p. 115-21, 1985.

KEMP, D.H., STONE, B.F., BINNINGTON, K.C. Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feedings apparatus, salivary gland secretions and the host response. In: Obechain, F.D., Galun, R. **Physiology of ticks**. Oxford, Pergamon Press, p.119-167, 1982.

KERRY, S.; TEKIPPE, M.; GADDIS, N.C.; ABALLAY, A. GATA transcription factor required for immunity to bacterial and fungal pathogens. **PLoS One**, v. 20, n. 1, 2006.

KLAFKE, G. M. **Resistência a lactonas macrocíclicas em populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) do Estado de São Paulo, Brasil: diagnóstico por bioensaios**. 2006. 65f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós – Graduação em Fisiologia Humana) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

KLEINO, A.; VALANNE, S.; ULVILA, J.; KALLIO, J.; MYLLYMÄKI, H.; ENWALD, H.; STÖVEN, S.; POIDEVIN, M.; UEDA, R.; HULTMARK, D.; LEMAITRE, B.; RÄMET, M. Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway. **The EMBO Journal**, v. 5, n. 24(19), p. 3423-34, 2005.

KOCAN, K. M.; MANZANO-ROMAN, R.; DE LA FUENTE, J. Transovarial silencing of the subolesin gene in three-host ixodid tick species after injection of replete females with subolesin dsRNA. **Parasitology Research**, v. 100, n. 6, p. 1411-5, 2007.

KUHN, K.H.; HAUG, T. Ultrastructural cytochemical and immunocytochemical characterization of the haemocytes of *Ixodes ricinus* (Acari: Cheficercata). **Cell and Tissue Research**, v. 277, p. 493-504, 1994.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, n. 4, p. 621-5, 2009.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2004.

LAGUEUX, M.; PERRODOU, E.; LEVASHINA, E.A.; CAPOVILLA, M.; HOFFMANN, J.A. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 10, n. 97(21), p. 11427-32, 2000.

LAMPROU, I.; MAMALI, I.; DALLAS, K.; FERTAKIS, V.; LAMPROPOULOU, M.; MARMARAS, V.J. Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes. **Immunology**, v.121, n. 3, p. 314-2, 2007.

LARA, F.A. ; BECHARA, G. H. ; LINS, U. ; OLIVEIRA, P. L. . Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n.16, p. 3093-3101, 2005.

LATIF, A.; JONGEJAN, F. The wide use of acaricides for the control of livestock diseases in Africa needs a reappraisal. **Newsletter on Integrated Control Pathogenics Trypanosomes and their vectors**, v. 6, p 10-12. 2002.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32 , n. 10, p. 1295-1308, 2002.

LEAL, A. T.; SEIXAS, A.; POHL, P. C.; FERREIRA, C. A., LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E.; TERMIGNONI, C.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Vaccination of bovines with

recombinant *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, p. 341-345, 2006 (b).

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster* **Annual Review of Immunology**, v.25, p.697-743, 2007.

LEMAITRE, B.; KROMER-METZGER, E.; MICHAUT, L.; NICOLAS, E.; MEISTER, M.; GEORGEL, P.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J.A. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.10, n. 92(21), p. 9465-9, 1995.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 20, n. 86(6), p. 973-83, 1996.

LEMAITRE, B.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J.A. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 23, n. 94(26), p. 14614-9, 1997.

LEVASHINA, E.A. Immune responses in *Anopheles gambiae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 673-8, 2004.

LI, A.Y.; DAVEY, R.B.; MILLER, R.J.; GEORGE, J.E. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.41, n.2, p.193-200, 2004.

LIMA, C. A.; SASAKI, S. D.; TANAKA, A. S. Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 347, n. 1, p. 44-50, 2006.

LIMA, E. A. L. A. Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, supl.3, p.17-20, 1989.

LIPA, J. J. Microbial control of mites and ticks. In: BURGESS, H. D. & HUSSEY, N. W. ed. **Microbial control of insects and mites**. 2<sup>a</sup> ed. London, Academic Press. Cap. 15, p.357- 374, 1971.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LOGULLO, C.; VAZ, I., SORGINE, M. H., PAIVA-SILVA, G. O., FARIA, F. S., ZINGALI, R. B., DE LIMA, M. F., ABREU, L., OLIVEIRA, E. F., ALVES, E. W., MASUDA, H., GONZALES, J. C., MASUDA, A. & OLIVEIRA, P. L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of the hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 116, p. 525-532, 1998.

LONDT, J.G.H.; ARHUR, D.R. The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrine, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). **Journal of the Entomological Society of South Africa**, v. 38, p. 321-40, 1975.

LOPES, R.B.; ALVES, S.B.; PADULLA, L.F.L.; PÉREZ, C.A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, p.27-31, 2007

MACHADO, A., SFORCA, M. L.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; MIRANDA, M. T. Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine alpha-hemoglobin: effects on the structure and anticandidal activity. **Biopolymers**, v.88, n.3, p.413-26, 2007.

- MARANGA, R.O.; KAAIA, G.P.; MUEKE, J.M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, Amsterdam, v.159, n.4, p.527-532, 2005.
- MARMARAS, V.J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 2, p. 186-95, 2009.
- MARTINS, J. R. & FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **Veterinary Record**, v. 149, n. 2, p. 64, 2001.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. JR. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 12, n. 296(5566)p. 298-300, 2002.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, p. 394-397, 1997.
- MELO, D.R.; REIS, R.C.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Patogenicidade *in vitro* do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.4, p.157-162, 2006.
- MENDES, M. C., VERÍSSIMO, C. J., KANETO, C. N., PEREIRA, J. R. Bioassays for measuring the acaricides susceptibility of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini,1887) in São Paulo State, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, p. 23-27, 2001.
- MENDES, M.C. **Resistência do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) aos piretróides e organofosforados e o tratamento carrapaticida em pequenas fazendas**. 2005. 127p. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Parasitologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- METCHNIKOFF, E. **Diseases of the larva of the grain weevil. Insects harmful to agriculture**. Odessa, UA: Odessa Zemstvo Office (in Russian), 1879.
- MICHEL, K.; KAFATOS, F.C. Mosquito immunity against *Plasmodium*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.5, n. 7, p. 677-89, 2005.
- MICHEL, T.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J.A.; ROYET, J. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. **Nature**, v. 13, n. 414(6865), p. 756-9, 2001.
- MOLINA-CRUZ, A.; DEJONG, R.J.; CHARLES, B.; GUPTA, L.; KUMAR, S.; JARAMILLO-GUTIERREZ, G.; BARILLAS-MURY, C. Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 3217-23, 2008.
- MONTEIRO, A. C.; FIORIN, A. C.; CORREIA, A. C. B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.2, p.109- 112, 1998.
- MONTEIRO, S. G. **Ação dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912, sobre o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em diferentes temperaturas**. 1997. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1997.
- MONTEIRO, S.G.; BAHIANSE, T.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, p.559- 563, 2003.

- MORAES, F.R.; COSTA, A.J.; WOELZ, C.R. Suscetibilidade natural comparativa entre taurinos e zebrinos a *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). **Ars Veterinária**, v. 2, p. 45-53, 1986.
- MÜLLER, U.; VOGEL, P.; ALBER, G.; SCHAUB, G.A. The innate immune system of mammals and insects. **Contributions to Microbiology**, v. 15, p. 21-44, 2008.
- MURRELL, A.; CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S. C. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 21, p. 244-258, 2001.
- MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 169-72, 2003.
- NAGAR, S. K. On the significance of the duration of preoviposition and oviposition periods in ixodid ticks. **Acarology**, v. 10, p. 621-629, 1968.
- NAPPI, A. J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioessays**, v.22, n.5, p.469-80, 2000.
- NARI, A. Strategies for control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Veterinary Parasitology**, 57: 153-165, 1995.
- NUNES, E.T.; BECHARA. G.H.; SAITO, K.C.; DENARDI, S.E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 36, p. 437-447, 2005.
- NUÑES, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E. & MOLTEDO, H. L. **Boophilus microplus, la garrapata comun del ganado vacuno**. 1a ed. Buenos Aires, Hemisfério Sur, 1982.
- NUTTAL, G.H.F.; STRICKLAND, C. On the presence of an anti-coagulin in the salivary glands and the intestines of *Argas persicus*. **Parasitology**, v.1, p. 300-310, 1908.
- NUTTALL, P. A.; TRIMNELL, A. R.; KAZIMIROVA, M. & LABUDA, M. Exposed and Concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 155-163, 2006.
- OBENCHAIN, F.D.; OLIVER, J.H. JR. A qualitative analysis of the form, function and interrelationships of fat body and associated tissues in adult ticks (Acari-Ixodoidea). **Journal of Experimental Zoology**, v. 186, n. 3, p. 217-36, 1973.
- 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.
- OLIVEIRA, G. P.; COSTA, R. P.; MELLO, R. P. & MENEGUELLI, C. A.. Estudo ecológico da fase não parasítica do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina; Ixodidae) no estado do Rio de Janeiro. **Arquivo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 4, p. 1-10, 1974.
- OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*D. hominis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, p. 127-35, 1990.
- OLIVEIRA, J.H.; GONÇALVES, R. L. S.; ALMEIDA, F. D.; GANDARA, A.C.; MENNA-BARRETO, R.; EDWARDS, C. M.; LAURINDO, F.R.; SILVA NETO, M. A. C.; SORGINE, M.; OLIVEIRA, P. L. Blood



Meal-Derived Heme Decreases ROS Levels in the Midgut of *Aedes aegypti* and Allows Proliferation of Intestinal Microbiota. **PLoS Pathogens**, v. 7, 2011.

OLIVEIRA, M.F.; D'AVILA, J.C.; TORRES, C.R.; OLIVEIRA, P.L.; TEMPONE, A.J.; RUMJANEK, F.D.; BRAGA, C.M.; SILVA, J.R.; DANSA-PETRETSKI, M.; OLIVEIRA, M.A.; DE SOUZA, W.; FERREIRA, S.T. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 111, p. 217-221, 2000.

OLIVER, J.H. Biology and systematic of ticks (Acari: Ixodida). **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 20, p. 97-430, 1989.

OMOTO, C.; ALVEZ, S. B. **Mecanismos de defesa de insetos contra entomopatógenos**. In: ALVES, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: FEALQ. 1998. 1163 p

OSTA, M.A.; CHRISTOPHIDES, G.K.; VLACHOU, D.; KAFATOS, F.C. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 15, p. 2551-63, 2004.

OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.M.; FONTENOT, J.D.; HAJJAR, A.M.; SMITH, K.D.; WILSON, C.B.; SCHROEDER, L.; ADEREM, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 13766-13771, 2000.

PAPADIMITRAKI, E.D.; BERTSIAS, G.K.; BOUMPAS, D.T. Toll like receptors and autoimmunity: a critical appraisal. **Journal of Autoimmunity**, v. 29, n.4, p.310-8, 2007.

PAQUETTE, N.; BROEMER, M.; AGGARWAL, K.; CHEN, L.; HUSSON, M.; ERTÜRK-HASDEMİR, D.; REICHHART, J.M.; MEIER, P.; SILVERMAN, N. Caspase-mediated cleavage, IAP binding, and ubiquitination: linking three mechanisms crucial for *Drosophila* NF-kappaB signaling. **Molecular Cell**, v. 29, n. 37(2), p.172-82, 2010.

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

PECONICK, A. P.; SOSSAI, S.; GIRÃO, F. A.; RODRIGUES, M. Q.; SOUZA E SILVA, C. H.; GUZMAN, Q. F.; PATARROYO, V. A. M.; VARGAS, M. I. & PATARROYO, J. H. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 1, p 37-43, 2008.

PEREIRA, L. S.; OLIVEIRA, P. L.; BARJA-FIDALGO, C.; DAFFRE, S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 66-72, 2001.

PEREIRA, M. C. **Boophilus microplus: Revisão taxionômica e morfo-biológica**. 1980. 126f. Tese (Mestrado)- Universidade de São Paulo, São Paulo. 1980.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (Orgs.). **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência**. 1 ed. São Paulo: MedVet, 2008. p15-53.

PERINOTTO, W. M. S. ; TERRA, A. L. M. ; ANGELO, I. C. ; FERNANDES, É. K. K. ; GOLO, P. S. ; CAMARGO, M. G. ; BITTENCOURT, V. R. E. P. . *Nomuraea rileyi* as biological control agents of *Rhipicephalus microplus* tick. **Parasitology Research** (1987. Print) <sup>JCR</sup>, v. 111, p. 1743-1748, 2012.

- PETER, R. J.; BOSSCHE, P. V. D.; PENZHORN, B. L.; SHARP, B.: Tick, fly, and mosquito control- Lessons from the past, solutions for the future. **Veterinary Parasitology**. v.132, p. 205-215, 2005.
- POLAR, P.; DE MURO, M. A.; KAIRO, M. T. K. PETERKIN, D.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S. A. Assessment of fungal isolates for development of a myco-acaricide for cattle tick control. **Vector Borne and Zoonotic Disease**, v.5, p.276-284, 2005.
- POSADAS, J.B., LECUONA, R.E. Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes:Clavicipitaceae) for the microbial control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p.284–291, 2009.
- PRETTE, N.; MONTEIRO, A. C.; GARCIA, M. V.; SOARES, V. E. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.855-861, 2005.
- RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, p.77–83, 2004.
- RATCLIFFE, N.; WHITTEN, M. Vector Immunity. In, "SGM Symposium 63: Microbe-vector interactions in vector borne diseases". Cambridge University Press. p. 199-262, 2004.
- REHNER, S. A. Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In: Vega, F.E.; BLACKWELL, M. **Insect-fungal Association Ecology and Evolution**. New York: Oxford University Press, 2005.
- REICHHART, J.M. Tip of another iceberg: *Drosophila* serpins. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 659-65, 2005.
- REIS, R. C. S.; CHACON, S. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; FACCINI, J. L. H. Efeito dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) e *Metarhizium anisopliae* Sorokin, (1883) na ecdise ninfal de *Amblyomma cooperi* (Nuttal; Warbuton, 1908)(Acari-Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.12, n.2, p.68-70, 2003.
- REIS, R. C. S.; MELO, D. R.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.6, p.788-791, 2004.
- RIBEIRO, J.M.C.; MAKOUL, G.T.; LEVINE, J.; ROBINSON, D.R.; SPIELMAN, A. Antihemostatic, anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.161 p. 332–344T,1985.
- RIVALIER, E. & SEYDEL, S. Nouveau procede de culture sur lames gélosés appliqué a l'étude microscopique de champignons deteignes. **Annals of Parasitology**, v.10, n.5, p.444- 452, 1932.
- ROBERTS, D. W.; HUMBER, R.A. Entomogenous fungi. In: BARRON, G.L. **Biology of conidial fungi**, v. 2, p. 201-236, 1981.
- ROBERTS, J.A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. Stages of the cycle of the parasite against which resistance is manifest. **The Journal of Parasitology**, v. 54, p. 667-673, 1968.
- ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, P. R.; LEITE, R. C.; CARDOSO, D. L.; CALIC, S. B.; FURLONG, J. Percepção dos produtores de leite de Divinópolis/MG sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae), 2001. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1235- 1242, 2006.

- RODRIGUES, J.; BRAYNER, F.A.; ALVES, L.C.; DIXIT, R.; BARILLAS-MURY, C. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Science**, v, 10, n. 329(5997), p. 1353-5, 2010.
- RODRIGUEZ, M.; MASSARD, C. L.; DA FONSECA, A. H.; RAMOS, N. F.; MACHADO, H.; LABARTA, V.; DE LA FUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, v.13, n.18, p.1804-8. 1995.
- ROSETTO, M.; ENGSTROM, Y.; BALDARI, C. T.; TELFORD, J.L. ; HULTMARK D. Signals from the IL-1 receptor homolog, Toll, can activate an immune response in a *Drosophila* hemocyte cell line. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 209, p. 111-116, 1995.
- RUDOLF, D.; KNULLE, W. Site of the mechanism of water vapour uptake from the atmosphere in ixodid ticks. **Nature**, v. 249, p. 84-85, 1974.
- RYU, J.H.; HA, E.M.; OH, C.T.; SEOL, J.H.; BREY, P.T.; JIN, I.; LEE, D.G.; KIM, J.; LEE, D.; LEE, W.J. An essential complementary role of NF-kappaB pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity. **EMBO Journal**, v. 25, p. 3693-3701, 2006.
- SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**. v. 129, p.389-413, 2004.
- SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annual Review of Entomology**, v.44, p. 159-182, 1999
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ- Editora, 2002. 265p.
- SAMSINAKOVA, A. *Beauveria globulifera* (Speg) Pic. Iako Parasit Klistete *Ixodes ricinus* L. **Zool. Listv.**, v. 6, p. 229-230, 1957.
- SAMSON, R. A.; EVANS, H. C. Two new *Beauveria* spp. From South America. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.39, p. 93-97, 1982.
- SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**. v. 98, n. 1-3, p. 89-109, 2001.
- SCHERFER, C.; KARLSSON, C.; LOSEVA, O.; BIDLA, G.; GOTO, A.; HAVEMANN, J.; DUSHAY, M.S.; THEOPOLD, U. Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. **Current Biology**, v. 6, n. 14(7), p. 625-9, 2004.
- SEIFERT, G. W.; SPRINGELL, P.H.; TATCHELL, R. J. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Parasitology**, v. 58: 415-430, 1968.
- SEIXAS, A.; LEAL, A.T.; NASCIMENTO-SILVA, M. C. L.; MASUDA, A.; TERMIGNONI, C. & DA SILVA VAZ JR., I. Vaccine potential of a tick vitellin- degrading enzyme (VTDCE). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 124, p. 332-340, 2008.
- SEIXAS, A.; OLIVEIRA, P.; TERMIGNONI, C.; LOGULLO, C.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ, I. JR. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v 15;148(1-2):149-56, 2012.
- SENGER, K.; HARRIS, K.; LEVINE, M. GATA factors participate in tissue-specific immune responses in *Drosophila* larvae. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 24, n. 103(43), p.15957-62, 2006.

SFORCA, M. L.; MACHADO, A.; FIGUEREDO, R. C.; OYAMA, S.; JR.; SILVA, F. D., MIRANDA, A.; DAFFRE, S., MIRANDA, M. T.; SPISNI, A.; PERTINHEZ, T. A. The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. **Biochemistry**, v.44, n.17, p.6440-51, 2005.

SHAPIRA, M.; HAMLIN, B.J.; RONG, J.; CHEN, K.; RONEN, M.; TAN, M.W. A conserved role for a GATA transcription factor in regulating epithelial innate immune responses. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 19, n. 103(38), p. 14086-91, 2006.

SILVA, A.M.; ALENCAR, M.M.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitos na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1477-1482, 2010.

SILVA, C.; GARY, B.D.; RAU, M.E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, p. 367-379, 2000.

SILVA, F. D.; REZENDE, C. A.; ROSSI, D. C.; ESTEVES, E.; DYSZY, F. H.; SCHREIER, S.; GUEIROS-FILHO, F.; CAMPOS, C. B.; PIRES, J. R.; DAFFRE, S. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 34735-34746, 2009.

SONENSHINE D. E. **Biology of Ticks**. In: *Oxford University Press*, Oxford, UK, 1991.

SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; HYNES, W. E.; MACALUSO, K. R.; AZAD, A. F. Expression of defensin-like peptides in tick hemolymph and midgut in response to challenge with *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Experimental and Applied Acarology**, v.28, n.1-4, p.127-34, 2002.

SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. **Frontiers in Bioscience**, v.13, p.7046-63, 2008.

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.

SOUZA, E.J. **Avaliação da eficácia in vitro dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 sobre ovos e larvas do carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae)**. 1999. 72 p. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1999.

SOUZA-NETO, J.A.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 20, n. 106(42), p. 17841-6, 2009.

STANLEY, D.W.; SHAPIRO, M. Eicosanoids influence insect susceptibility to nucleopolyhedroviruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, p. 245-249, 2009.

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

STEELE, J. H. Control of metabolic processes. In: Kerkut, G.A.; Gilbert, L.I., Editors, 1985. **Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology**, Pergamon, Oxford, p. 99-146, 1985.

STRAND, M. R.; PECH, L. L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships.

**Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 31–56, 1995.

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

SUTHERST, R.W.; MAYWALD, G. F.; KERR, J. D.; SIEGEMAN, D. A. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Boss indicus* x *Bos taurus* steers. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 34, p. 317-327, 1983.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. DNA-viral infections: Baculoviridae, Chapter 6, p. 171-244. In: **Tanada, Y. & H.K. Kaya (eds.). Insect Pathology**. San Diego, Academic Press, 1993, 666p.

TELLAM, R. L.; KEMP, D.; RIDING, G.; BRISCOE, S.; SMITH, D.; SHARP, P.; IRVING, D. & WILLADSEN, P. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 141-156, 2002.

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

TINGVALL, T.O.; ROOS, E.; ENGSTRÖM, Y. The GATA factor Serpent is required for the onset of the humoral immune response in *Drosophila* embryos. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 27, n. 98(7), p. 3884-8, 2001.

TSVILENEVA, V.A. Comparative histology of the blood and connective tissue formed elements of haemolymph in ixodid ticks. **Arkh. Anat. Gistol. Embriol.**, v. 40, p. 91–100, 1961.

TSVILENEVA, V.A., On the morphology of the connective tissue of ixodid ticks. **DOKLADY AKADEMII NAUK SSSR**, v. 24, p. 171–177, 1963.

TSVILENEVA, V.A., The nervous structure of the ixodid synganglion (Acarina: Ixodoidea). **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 135–142, 1965.

TZOU, P.; REICHHART, J.M.; LEMAITRE, B. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 19, n. 99(4), p. 2152-7, 2002.

UTECH, K.B.W.; WHARTON, R.H.; KERR, D.J. Resistance to *B. microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, p. 885-95, 1978.

VALANNE, S.; WANG, J.H.; RÄMET, M. The *Drosophila* Toll signaling pathway. **The Journal of Immunology**, v. 15, n. 186(2), p. 649-56, 2011.

VILLARES, J.B. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. **Boletim de Indústria Animal**, v. 4, p. 60-79, 1941.

WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W.; TURNER, H.G. Resistance to the cattle tick, *B. microplus*, in a herd of Australian Illawarra Shorthorn cattle: its assessment and heritability. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 21, p. 163-81, 1970.

WIGGLESWORTH, V.B. **The principles of insect physiology**. Methuen, London, 1967, 742p.

WILLADSEN P. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 164-7, 2008.

- WILLADSEN P.; JONGEJAN F. Immunology of the Tick-Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. **Parasitology Today**, v.15, n.7, p.258-62.1999.
- WILLADSEN, P. & KEMP, D. H. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. **Parasitology Today**, v. 4, p. 196-198, 1988.
- WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, v. 129, p. S367-S387, 2004.
- WILLADSEN, P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 353-367, 2001.
- WILLADSEN, P. Tick control: thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 161-168, 2006.
- WILLADSEN, P.; RIDING, G. A.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; TELLAM, R. L.; NIELSEN, J. N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G. S. & GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod: Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus* **The Journal of Immunology**, 143:1346-1351, 1989.
- WOOLLEY, T.A. **Acarology. Mites and Human Welfare**. John Wiley, New York, 1988. 484p.
- XI, Z.; RAMIREZ, J.L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 4(7), p. e1000098, 2008.
- YOUNG, A. S. & MORZARIA, S. P. Biology of *Babesia*. **Parasitology Today**, v.2, p. 211-219, 1986.
- YOUNT, N. Y.; BAYER, A. S.; XIONG, Y. Q.; YEAMAN, M. R. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. **Biopolymers**, v.84, n.5, p.435-58, 2006.
- ZHIOUA, E.; BOWING, M.; JONHSON, P.W.; GINSESBERG, H.S.; LEBRUM, R.A. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularum* (Acari: Ixodidae). **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 5, p. 815-818, 1997.

## 8. ANEXOS

### Anexo A. Alinhamento de proteínas Toll e Toll *-like*.











810 820 830 840 850 860 870 880  
RpToll-like-JAA59716.1 KKLKRVLDLRRNLIQFDINNDIYLALAKLALDNNIYTLRVNLIISTEVSILRPNKIKAVQVTELEILKRVKTEKRYTND  
RmToll-like KKLKRVLDLRRNLIQFDINNDIYLALAKLALDNNIYTLRVNLIISTEVSILRPNKIKAVQVTELEILKRVKTEKRYTND  
IxTollA-XP\_002399580.1 KKLKRVLDLRRNLIQFDINNDIYLALAKLALDNNIYTLRVNLIISTEVSILRPNKIKAVQVTELEILKRVKTEKRYTND  
DmTollC-NP\_001262995.1 KKLKRVLDLRRNLIQFDINNDIYLALAKLALDNNIYTLRVNLIISTEVSILRPNKIKAVQVTELEILKRVKTEKRYTND  
DmTollB-NP\_524518.1 HGLLTLNLRNNSIIFVYNDWKTMLQRELDLSDYNNISLGLYEDLAFLSQNRHLVNMTHNKIRRIALPEDVHLGEGYN  
DmTollD-NP\_733166.1 HGLLTLNLRNNSIIFVYNDWKTMLQRELDLSDYNNISLGLYEDLAFLSQNRHLVNMTHNKIRRIALPEDVHLGEGYN  
DmTehao-NP\_477438.1 HGLLTLNLRNNSIIFVYNDWKTMLQRELDLSDYNNISLGLYEDLAFLSQNRHLVNMTHNKIRRIALPEDVHLGEGYN  
AaToll-XP\_001663801.1 NNLRVNLKNNNSISAILHDDWYNALQLRELDLSDYNNISLGLYEDLAFLSQNRHLVNMTHNKIRRIALPEDVHLGEGYN  
AaToll-XP\_001658507.1 ENLQILNLRNNSITTFQDWTNNLHRELDLSDYNNISLGLYEDLAFLSQNRHLVNMTHNKIRRIALPEDVHLGEGYN  
AgToll-XP\_309197 HQLRRELDLSSNMLTAVPDRILLNTHQLRNLNTRNNTSLTYANLQFLAPAITVDLRLHNSIFEIDLADMERLVLEPRNFD  
AgToll-AAL37901.1 HQLRRELDLSSNMLTAVPDRILLNTHQLRNLNTRNNTSLTYANLQFLAPAITVDLRLHNSIFEIDLADMERLVLEPRNFD  
AaToll-XP\_001658496.1 CQKRLNLRNNSISTIFQDWTNNLHRELDLSDYNNISLGLYEDLAFLSQNRHLVNMTHNKIRRIALPEDVHLGEGYN  
AaToll-XP\_001647905.1 MQLRELDLSSNMLTAVPDRILLNTHQLRNLNTRNNTSLTYANLQFLAPAITVDLRLHNSIFEIDLADMERLVLEPRNFD  
AgToll-like5-XP\_560220.3 AQLTDLSDLSTNATIKIPDFKFMKGLDLSNLMNLSKDFSLSPKIEKVNLESNRITMFTFDLSDKSKSTFSVNR  
AgToll-like1A-XP\_311355.3 HKVRLDLSNADHLFVDFKFMKGLDLSNLMNLSKDFSLSPKIEKVNLESNRITMFTFDLSDKSKSTFSVNR  
DmToll4-NP\_523519.2 EITIDAFGSPDKYFN----LKLMEALNHAIVLPSGDFEILILHLNLSPPCYRCCCFEHTGFLNCRVSLDLYPRLPNSI  
DmMstProx-NP\_649719.2 QLLQSMRKLNNLNTIMSIIYKIMEVLRKLLFVNRVDFLYRQMAAPCPHKCECCYSRDSLILKIDCRKVFYVNF--DIV  
IxToll-XP\_002406803  
IxToll-XP\_002406802  
IxToll-XP\_002406804  
RpToll-like6-JAA63491.1 ELEDKMKHLKILDASSNHIREINAGSFPNQQEIMINLSNRRISIIHPPTFMKHNLTQVNLQRLDINAFRLKPT  
RmToll8-Like  
IxToll8-XP\_002402229 ELEDKMKHLKILDASSYNNIKENAAASFPNQQEIVSLSMNRISIIHPPTFMKHNLTQVNLQRLDINAFRLKPT  
IxToll-XP\_00240628.1 ELESILKRLFLDVSNNRLTDLSSSLPNGEIVFLRNNQLRRIPPTFLGKQNLTRVDLNRLELDMFRLSEVP--S  
AaToll-XP\_001649808.1 GMDNQLYLQFLDASFNRLTKVTPSSIPNSIEFLFLNDNQIMHVEPHCFIHKNTLTRVDLYANQLTGLDKMRLQVPP--D  
AgToll-like6-XP\_320172.2 GLDNQLHLQFLDASFNRLTKVTPATIPNSIEFLFLNDNLIVHVEPHCFIHKNTLTRVDLYANQLTGLDKMRLQVPP--E  
DmToll6-NP\_524081.1 GLDSELKQFLDVSFNQRLQIGPSSIPNSIEFLFLNDNLITVDFPDMHKNTLTRVDLYANQLTGLDKMRLQVPP--E  
DmToll10-NP\_524757.1 EISELSELSTFDASYNLLTEITASSIPNSVEVLYLNDNLISKIQPYTFPKKPNLTRVDLVRNRLTTLDPNALRISVPA--E  
AaToll-XP\_001649813.1 EISELSELSTFDASYNLLTEITASSIPNSVEVLYLNDNLISKIQPYTFPKKPNLTRVDLVRNRLTTLDPNALRISVPA--D  
AaToll-XP\_001660216.1 DVGNWFLQKMLDVSNNRIKYINSNPPKNIETLLNNDLIEELAPETFTSKESIVKVVLYGNHRRLEMSLALTRV--D  
AaToll-XP\_001648238.1 DLNN-LQIKMLDVSFNRLVSDVNDNIPDSIEFLFLNDNLIEEVAAGTFLNKKKLEKVVLYGNHRRLEMSLALTRV--D  
AaToll-XP\_001655730.1 KLOEBEIKVKFLDASHNRLTDIGPMNVPSVLELFLVNDNHISTHANTFIDKINLARVDYANSLKGLQLQRLVAPQP--V  
AgToll-like7-XP\_320221.4 KLOEBEIKVKFLDASHNRLTDIGPMNVPSVLELFLVNDNHISTHANTFIDKINLARVDYANSLKGLQLQRLVAPQP--T  
DmToll17-NP\_523797.1 KLOEBEIRVTKFLDASHNRLTEIGPMSPNPTIEFLFLNNDLIGVQNAFVDRKANLARVDYANSLKGLQLQRLVAPV--A  
Dm18weeler-NP\_476814.1 KLOEBEIRVTKFLDASHNRLTEIGPMSPNPTIEFLFLNNDLIGVQNAFVDRKANLARVDYANSLKGLQLQRLVAPV--A  
HsToll-like7-NP\_057646.1 AYQKALDLSLNSIIFVYNDWKTMLQRELDLSDYNNISLGLYEDLAFLSQNRHLVNMTHNKIRRIALPEDVHLGEGYN  
HsToll-like8-NP\_619542.1 TLFNFTDLSDLSTNATIKIPDFKFMKGLDLSNLMNLSKDFSLSPKIEKVNLESNRITMFTFDLSDKSKSTFSVNR  
HsToll-like9-NP\_059138.1 EIPSNMNIKNTFVSGTRMVMHMLCPSKISFPLHLDPSNLLTDFVENCCHLLETELLIQMNLKLESKLAEMTTPQMS--  
HsToll-like1-NP\_003254.2 TVFSEMNIIMLTISDTPFHMLCPHAPSTFKLNFTQNVFTDSIFEKCSLTKLETLILQKGLKDLKVLGMLTKDMP--S  
HsToll-like6-NP\_006059.2 LLLTKMDIENLTISSNAQMPHMLFPNYPPTKQYLNFPANNILTDLDFKRTIQLPHKTLILQKGLKDLKVLGMLTKDMP--S  
HsToll-like10-NP\_112218.2 ERVKRITVENSKVFLVPCLLSQHLSLEVLDLSENIMVEEYLNKNSACEDAWPSLQTLILRQMLASLKEKGEFTLLTKN--  
AaToll-XP\_001653990.1 -----MVNLRVNLKNNIIPPNLLISQETS-----  
AaToll-XP\_001650338.1 DGLDLSLQMLALHNNRIWKINDRVNLGRVNEKIGLHNNIYNLSNPAFNELELLKVIHLYVNLKIRVDLQRLDINAFRLKPT  
HsToll-like3-NP\_619542.1 GHLEVLDLGLNIEGQELTG--QEWRELENIETIYLSNRYKQLTRNSFALVPSLQRLMRLNLRNNSISSPFPQPLR--  
HsToll-like4-NP\_612564.1 FGTSLKLVLDLDFNGVITMSSNLFLEGLHLDLQHSNLSKMSSEFVFLSRLNLIYDLSITHTH--  
HsToll-like5-NP\_003259.2 EKLQTLDRDNALTTIIFLPSIDPILFSLGNKLVLEPKINLANLHLSNRENLIDLVLVLLRVPHLQILILNQRNFS--  
DmToll9-NP\_649214.1 ---IANTLKVLYFERSNIDKLEWSKSLKQLVGLAGNINALTAMPQSLSELEILDSSNHWGNVRSAPFHNSALR--  
IxToll-XP\_002400887 IKFLDLSGYDRGVLQDLDVDFVSKMVLNREIAYTYDAFVYSNSDQWVIRSLLPQLCESTISNLKLYDRDVFVAG--  
Clustal Consensus

910 920 930 940 950 960 970 980  
RpToll-like-JAA59716.1 CQLYDFIKYLSNDD--QKDLALFKNSPSYTCESPKVLRGNLDDVDPQLICTIKEN  
RmToll-like CQLYDFIKYLSNDD--QKDLALFKNSPSYTCESPKVLRGNLDDVDPQLICTIKEN  
IxTollA-XP\_002399580.1 CQLYDFIKYLSNDD--QKDLALFKNSPSYTCESPKVLRGNLDDVDPQLICTIKEN  
DmTollC-NP\_001262995.1 CHIYDFIKYLSNDD--QKDLALFKNSPSYTCESPKVLRGNLDDVDPQLICTIKEN  
DmTollB-NP\_524518.1 CTILWFILVLRGVHKKPQYSRQFKLRDRLVCSQPNVLEBGTTPVRQIEPOTLICPLDFSDDPRE  
DmTollD-NP\_733166.1 CTILWFILVLRGVHKKPQYSRQFKLRDRLVCSQPNVLEBGTTPVRQIEPOTLICPLDFSDDPRE  
DmTehao-NP\_477438.1 -----TFQYGATLLMNVAVVCTN-----DEACQYKSAE  
AaToll-XP\_001663801.1 CSALSFVQYIQDP--SSSIRRIQFSTRELHCLTPENLNGTKVSIIVPLADLTQLDQP  
AaToll-XP\_001658507.1 CVIFSFFVQYLLNELDVAVYRRIQFVADDLRCSEPPNLEGVVHVKIQTKDLQLDQPGTEI  
AgToll-XP\_309197 CIAYAFAYQIQNRLATAVYDRFELVANELTCHGPEHLEGALIKVPTRELLCELDTPSTAI  
AgToll-AAL37901.1 CIAYAFAYQIQNRLATAVYDRFELVANELTCHGPEHLEGALIKVPTRELLCELDTPSTAI  
AaToll-XP\_001658496.1 CNALKFIQLIQSK---PEHGLQFNVDLRCSEPPNLDVDMQTKDLCDPESA  
AaToll-XP\_001647905.1 CQVTSFVQFLQMTG--HVIYRWRFTVDHLCVCEPPDNLNRNVVKNVANLCKID  
AgToll-like5-XP\_560220.3 C1SSSLVLYLQDQL---NAGKFPVLEKGLHCAQPELLEGRKQDLSLEDLCKIDVSSG  
AgToll-like1A-XP\_311355.3 CMSYPLVLYKAES---YSSKSDMLEGLQCAQPKLGLGLQVLEDLICADASSG  
DmToll4-NP\_523519.2 NTESLVAVGASHIKLHMSQNLRELPHLHPENTYVLDVRNLLKYLDDGVIAFLYRENI  
DmMstProx-NP\_649719.2 -----MSSPEMLHLSKNNISNITIAMLPKELRFLDRLFNVLVLDLDDKVLSTYK--KNS  
IxToll-XP\_002406803  
IxToll-XP\_002406802  
IxToll-XP\_002406804  
RpToll-like6-JAA63491.1 CSMEWLQRINSLDQ--QYQVMDLAKVVCQMPFGRRRPRLLLSEANSSDFLCKYKSHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
RmToll8-Like -----TSFGP-----EFGCC  
IxToll8-XP\_002402229 CTMEWLQRINSLDQIRQYPRVVDLNEVMCQMPFGRRRPRLMLSDANSSDFLCKYKSHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
IxToll-XP\_00240628.1 CHMEWLQRINSLDQSRQYPRVIDLADVCHLSFTRRKATLPLVKAHSSQFLCRVNRHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
AaToll-XP\_001649808.1 CNIDWLQKINH-VTSRQYPTINDIEVYCKLPMYRNSFYPLIEAPEKHFCLNYQTHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
AgToll-like6-XP\_320172.2 CNIDWLQKINH-VTSRQYPTINDIEVYCKLPMYRNSFYPLIEAPEKHFCLNYQTHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
DmToll6-NP\_524081.1 CNIDWLQKINH-VTSRQYPTINDIEVYCKLPMYRNSFYPLIEAPEKHFCLNYQTHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
DmToll10-NP\_524757.1 CNIDWLQKINH-VTSRQYPTINDIEVYCKLPMYRNSFYPLIEAPEKHFCLNYQTHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
AaToll-XP\_001649813.1 CNLNLWQKNN--VDSRTQPKMLDSDIYKLLYNR--RTYVPLVLEAKPQFLCKYETHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
AaToll-XP\_001660216.1 CSMEWLQRINSLDQSRQYPRVIDLADVCHLSFTRRKATLPLVKAHSSQFLCRVNRHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
AaToll-XP\_001648238.1 CTMEWLQKINSLRQHPVMDLDVCMGTEHERGASIRPLMDLNTDFLQCYETHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
AaToll-XP\_001655730.1 CSMEMQRVNN-LTARQHPKILDLPNVEGIMPHARGSPTRIPRISLKPFLCKYETHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
AgToll-like7-XP\_320221.4 CSMEMQRVNN-LTARQHPKILDLPNVEGIMPHARGSPTRIPRISLKPFLCKYETHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
DmToll17-NP\_523797.1 CTMDWLQRINN-LTTRQHPKIMDLPNVEGIMPHARGSPTRIPRISLKPFLCKYETHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
Dm18weeler-NP\_476814.1 CSMEWLQRINN-LTTRQHPKIMDLPNVEGIMPHARGSPTRIPRISLKPFLCKYETHCFALCHCCCFDACCDEMVCPEPNTCY  
HsToll-like7-NP\_057646.1 GITHMLNFTKQ---LKVQLKMMNDISSSTRTMESESLRTEFRGNHLDVLRNDRNLRDLPKNI  
HsToll-like8-NP\_619542.1 CVTHHLEFIQ---FTNLKVLNLSHNNIYTLTDKLNLEKSLVLEVDFSGNRLDILNDDNRRYISIFKQ  
HsToll-like9-NP\_059138.1 CVGHNFVFAH---LRLRLHLSLAHNNHSQVSO--QLCSTSLRALDFSGNALCHMMAEED-LVLIHFQCC  
HsToll-like1-NP\_003254.2  
HsToll-like6-NP\_006059.2  
HsToll-like10-NP\_112218.2  
HsToll-like2-NP\_003255.2  
AaToll-XP\_001653990.1  
AaToll-XP\_001650338.1  
AaToll-XP\_001658496.1  
HsToll-like3-NP\_619542.1  
HsToll-like4-NP\_612564.1  
HsToll-like5-NP\_003259.2  
DmToll9-NP\_649214.1  
IxToll-XP\_002400887  
Clustal Consensus



```

.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....
RpToll-like-JAA59716.1 TFFPKVWLRGHVVMKDYLDIACGEKISLNDTLALSYINEI
RmToll-like TFFPKVWLRGHVVMKDYLDIACGEKISLNDTLALSYINEI
IxTollA-XP_002399580.1 TFFPKVWLRGHVVMKDYLDIACGEKISLNDTLALSYINEI
DmTollC-NP_001262995.1 AKPLLLFTQDNFERIGDRNEMMCVNAEMPTRMVELSTN
DmTollB-NP_524518.1 AKPLLLFTQDNFERIGDRNEMMCVNAEMPTRMVELSTN
DmTollD-NP_733166.1 AKPLLLFTQDNFERIGDRNEMMCVNAEMPTRMVELSTN
DmTehao-NP_477438.1 SL5LLFFVFRTPNORVRDIADIVCKOKKK--SFOQMEAF
AaToll-XP_001663801.1 SAPFLDFVQQTQLIADTHTITCP--NGQRVLAISVV
AaToll-XP_001658507.1 SAQFMNFVQQNHKKIADLQGITCE--TGEFFSLITVN
AgToll-XP_309197.1 TTQLLFFAHANQRRIEDFRLRCS--DGRPLEQMTLS
AgToll-AAL37901.1 TTQLLFFAHANQRRIEDFRLRCS--DGRPLEQMTLS
AaToll-XP_001658496.1 ASSFLIFVQNSRLISDMSAVRCHPSCKSLDSITVN
AaToll-XP_001647905.1 SIDHLRVIQTSDRIEDSKYMRCS--DGRLLNLTVS
AgToll-like5-XP_560220.3 N-PLLAFAVDNAARITCYSTLQCS--DQGPINSATLN
AgToll-like1A-XP_311355.3 N-PLLFFAVDNAARITDYVVLQCI--DQGPINSATLK
DmToll4-NP_523519.2 DKDFLVFKKQAKNANASAGCI-----DGRSLI
DmMstProx-NP_649719.2 DIKINFMKSVSSSIVDFTEIKCS-----N-GEKLV
IxToll-XP_002406803
IxToll-XP_002406802
IxToll-XP_002406804
RpToll-like6-JAA63491.1 FLSRFQTWAR--GSLPRDAASVRCGR--GPFLLFDASSCGGAN
RmToll8-Like FLSHFQAWAR--GSLPRDAASVRCGR--GPFLLFDASSCGGAN
IxToll8-XP_002402229 FMENFDQVHMF--GAPLKDSVAIRCGNQT--GPFLLFNATACNTFT
IxToll-XP_002400628.1 FAQEFDFLQNGAELVRLDFSIQCVHNETS--ALPLWELNNTTCTNVS
AaToll-XP_001649808.1 FLNKLRIYVLSQSN--TEKIDANEISCVYNNLTS--ILKKNKGTCK--TFRG
AgToll-like6-XP_320172.2 FVNKLRSLVLSQSN--ADKIVDANEISCVYNNATS--ILRD--NGTKC--TFR
DmToll6-NP_524081.1 YLARFKNVLSQSN--SEKIDASRVCYNNATS--VLRKNGTKC--TLR
DmToll8-NP_524757.1 FIDKLRDYIHR--HEYVDKLRMKC--DVISGNSTQGMV--IYPGSGEPASL--PVVQ--CSQTLPLG
AaToll-XP_001649813.1 YVEKFRREYKLT--YDFVRDKVRCRCSATITSGNDTAMIVGG--AVNGSATGASA--VLPKGVDDSGESNGVGVGGFL
AaToll-XP_001660216.1 SMGKLVDAERQ--FNEITNGLESFQCSNNKLLK--DAIKCEGSHKS--AP
AaToll-XP_001648238.1 SLHKMQRVIRDV--GGEFD--INRMICADNRVVG--DVISGCEGRME--FDNE
AaToll-XP_001655730.1 FMQELTSFVADN--AVIQDQDVIYCSGNG--VFRGLDFN--VS
AgToll-like7-XP_320221.4 FLPELTAFAVDN--AVIVQDQDVIYCSGNG--VFRGLDFN--VS
DmToll7-NP_523797.1 FLQALTSFVADN--ALIVQDQDVIYCSGNG--VFRGLDFN--ATG
Dm18weeler-NP_476814.1 QLRELAQVSDN--AMVVRDADHIVCLDAG--IKRELELIGN--LANG
HsToll-like7-NP_057646.1 AVWFVWVN--HTEVTPYLAADTVCVGGGAK
HsToll-like8-NP_619542.1 IGDFFRRMDEHLNPKI--PRLV--DVICASPQDQR
HsToll-like9-NP_059138.1 AAFMDFLLE--VQAAVGPLSRVRCGSPGQLQ
HsToll-like1-NP_003254.2 LGEFVKINIDQVSSSEVLEGGWPD SYKCDY PYSYR
HsToll-like6-NP_006059.2 LRFVFNKIDQVSSSEVLEGGWPD SYKCDY PYSYR
HsToll-like10-NP_112218.2 LKNFIQ--LETYSVMMVWSDSYTCYPLNLR
HsToll-like2-NP_003255.2 FLSFTQEQALAKVLDWPANVYLCDSPSHVRG
AaToll-XP_001653990.1
AaToll-XP_001650338.1 HLKSLINLRVLSVFNNNLESLHNDQFLNN
HsToll-like3-NP_003256.1 SIWFWVNIWNETHTNIPELSSHYLCNTPPHYHG
HsToll-like4-NP_612564.1 HQSFLQWIKDORQLLVEVERMECATPSDKQGMF
HsToll-like5-NP_003259.2 LSTFNLWLNHTNVTIAGPPADIVCYVDPDSFGSVLFS
DmToll19-NP_649214.1 TDQLQVDELNCQIRSMSDLABELHHVTN
Clustal Consensus
.....1310.....1320.....1330.....1340.....1350.....1360.....1370.....1380.....
RpToll-like-JAA59716.1 PDVFCPTDYSQAKKQLAAVSVICLLAVLLVVLVLLYRNROTIIAYVYIH--FYNVFCVFSSEEDLDEDK
RmToll-like PDVFCPTDYSQAKKQLAAVSVICLLAVLLVVLVLLYRNROTIIAYVYIH--FYNVFCVFSSEEDLDEDK
IxTollA-XP_002399580.1 PDVFCPTDYSQAKKQLAAVTAICVLLAVLLVVLVLLYRNROTIIAYVYIH--FHNVFCVFSSEEDLDEDK
DmTollC-NP_001262995.1 DICPAEKGVFIALA--VVIATGLLAGFTAALYKQTEIKIWLVAH--NLLWVFTVEE--DLDDDK
DmTollB-NP_524518.1 DICPAEKGVFIALA--VVIATGLLAGFTAALYKQTEIKIWLVAH--NLLWVFTVEE--DLDDDK
DmTollD-NP_733166.1 DICPAEKGVFIALA--VVIATGLLAGFTAALYKQTEIKIWLVAH--NLLWVFTVEE--DLDDDK
DmTehao-NP_477438.1 ELCP--SYVLLIS--CVVGLVVICLLVYFVYLMQQLKIWLVAH--NLLWVFTVEE--DLDDDK
AaToll-XP_001663801.1 ELCKERWIMVAVS--LSILVGLVIGLSTAVCFAYHNEIKIWLFRK--NLLMCMWTEQE--EVDKDK
AaToll-XP_001658507.1 SLCHESVTVTITIS--VILSILGLLIGLFTVYVYHMEIKVWLFTH--NMLCVFVSEE--EIDKDK
AgToll-XP_309197.1 DILCVDRTHMIVLTC--VIVSVVACLVAALSIVYTYKLEIKVWLFKH--GLCLWVAEE--EIDRDK
AgToll-AAL37901.1 DILCVDRTHMIVLTC--VIVSVVACLVAALSIVYTYKLEIKVWLFKH--GLCLWVAEE--EIDRDK
AaToll-XP_001658496.1 ELCEFEDYTKVIC--FAIAYVGLVGLISLLEFFRYQTEVWVWLFTH--NPLFLSITVEE--EIDKDK
AaToll-XP_001647905.1 DVCHVDVITPITIS--MCLVII--LILLITFVAYAYQIEIKIWLFTN--NCLRLVTEE--EIDKDK
AaToll-like5-XP_560220.3 DILCAWPTLKPFIY--AAVSLVAACLLAAILWVYKYSLEIKVWLFKH--NLLQWVTEE--QIDMDK
AgToll-like1A-XP_311355.3 ELCAWPTLFRLYISAAVAFAVIGCILTIVLWVYKYNLEIKVWLFKH--NLLQWVTEE--QIDMDK
DmToll4-NP_523519.2 VEEDTICPSVLIYYTSLAVSLIILALSINVPICFROPIMVWFYEH--EICLSLAAR--ELEDKDK
DmMstProx-NP_649719.2 SINQHVCSPLDFYMLALASLVATIIALNVLWFRQPVVWVWFYEH--GVCLSLAKR--ELEDKDK
IxToll-XP_002406803 PSVSVKAVSYGILFMLVLAALAVTSTVYLYKREIKVWLYAR--GLCRSLQCIKEDDLDEDK
IxToll-XP_002406802 PSMMSKILSYGLLPLLVLLIISLAASTAYLRKRAIKVWLYAR--GVCSSLCQIKEDDLDEDK
IxToll-XP_002406804 LSTIEGAFQTSKRLMFLACALASTAYLRKREIKVWLYAR--GLCRSLQCIKEDDLDEDK
RpToll-like6-JAA63491.1 GTGWAEPAPAAQAQEPHQLPPLVPLLIAAPSALVLLVLLGAVLAACVRRQIKLWLSR--CGLRFLDRAESEPE--R
RmToll8-Like GTGWAEPAPAAQAQEPHQLPPLVPLLIAAPSALVLLVLLGAVLAACVRRQIKLWLSR--CGLRFLDRAESEPE--R
IxToll8-XP_002402229 DNIMPELLVLPVSVVLLLVFLVLLVYVYRQMKVWVYHSHK--YGVRLFRRSQYAEVDK
IxToll-XP_002400628.1 EATTLVRFHQ--VEDLVPLLVLAALFLLVLCVIVLAFVRRHLSVWVYTK--YGVRFRRSQYAEVDK
AaToll-XP_001649808.1 EGMSISVHROEIED--MLPLLIVATCAFVGFGLIFGFCYRKEIKVWVHSS--CFGSLCYKSGTFVNE--YDKD--R
AaToll-like6-XP_320172.2 EGMSISVHROEIED--MLPLLIVATCAFVGFGLIFGFCYRKEIKVWVHSS--GLCYKSGTFVNE--YDKD--R
DmToll6-NP_524081.1 DGVAHYMHTNEIEG--LLPLLIVATCAFVGFGLIFGFCYRKEIKVWVHSS--GLCYKSGTFVNE--YDKD--R
DmToll8-NP_524757.1 ASNATSTKMLNQPPKID--YIPILVAILTAFVVMICISLVFIFRQEMRVWVHSS--FGVRLFYNAQMDK--NERD--K
AaToll-XP_001649813.1 NIINGNLTSRKTVLSPPPLEG--YIPILVAILTAFVVMICISLVFIFRQEMRVWVHSS--FGVRLFYNAQMDK--NERD--K
AaToll-XP_001660216.1 IATPTVQRTIID--NDFID--YLPLLVLAAGLVLTILVLLVLFVFRDCLVAHSS--YGVRIKCDPLNAMERDSE--K
AaToll-XP_001648238.1 VAPPVAVHTVLMGHGLGGVPLLAALIVAIIGTALIVALACVFRQDRLWAHAK--YGVRIKCDPLNAMERDSE--K
AaToll-XP_001655730.1 ASCSDYFAG--SSVLP--DRLESETH--IFFLAALAIACLLVFLVMMFFRPELRFWLSR--YGVRFRRSQYAEVDK
AgToll-like7-XP_320221.4 AACSDYFAG--RSLVLP--DRLESETH--IFFLAALAIACLLVFLVMMFFRPELRFWLSR--YGVRFRRSQYAEVDK
DmToll7-NP_523797.1 AACSDYFAG--GSMQLG--HGIPESY--IFFLAALAIACLLVFLVMMFFRPELRFWLSR--YGVRFRRSQYAEVDK
Dm18weeler-NP_476814.1 PDCSDLLDASASNISSQDLAGGVRLEPLLAALVLLVLLVLLVYVYRQMKVWVYHSHK--YGVRFRRSQYAEVDK
HsToll-like7-NP_057646.1 GQSVISLDLYTCGLDITNLLIFSLISVSLFIMMNTASHLWVYVYHFCCKAKI--YGVRFRRSQYAEVDK
HsToll-like8-NP_619542.1 GKSIVSELITTCQSDVAVILVFFFTFTMMVLAALAHLLFYDNDVFIYVNLCLAKV--YGVRFRRSQYAEVDK
HsToll-like9-NP_059138.1 GLSIFAQDRLICGLDEALSWDFCALSLAVALCLGVMPLHHLGGWLDVYCFHLCLAWLWVYRQSGRQSDDEADL--L
HsToll-like1-NP_003254.2 GTLLKDFHMSSELSCTNILLIVTIVATMLVLAATVTSLSCLYLDLPWYLRMVCQWQTRRRARRNIPLEELQRN--L
HsToll-like6-NP_006059.2 GSPKDFHMSSELSCTNILLIVTIVATMLVLAATVTSLSCLYLDLPWYLRMVCQWQTRRRARRNIPLEELQRN--L
HsToll-like10-NP_112218.2 GTRLKDVLHMSSELSCTNILLIVTIVATMLVLAATVTSLSCLYLDLPWYLRMVCQWQTRRRARRNIPLEELQRN--L
AaToll-like2-NP_003255.2 QQVQDVRVLSVSEICRITVALVSGMCCALFLLILLVGLVCHRRHGLNVMQDM--WAPLQAKRKRQKAPSRRI
AaToll-XP_001653990.1
AaToll-XP_001650338.1 LLNLSLELDYLNQNDIPITLFEKA
HsToll-like3-NP_003256.1 EALELEFLDQNEISESTNAFNGLRRLRILYLSKVLTEIQG--VFGAALAEFLKLDRIIS
HsToll-like4-NP_612564.1 FVRLRFDTSCKDAPPELFMNTSILLIFITVILLHFGWRISFYNN--VSVIRFLGPKRIDRQEQF
HsToll-like5-NP_003259.2 VLSNLTCPQMKNTIIGVSVLVVSVVAVLVYKVFHMLLAKG--CHIKYGRGE--N
DmToll19-NP_649214.1 LSTEGDDEEVLNLSKPSLITVCTVLTILFLMTLITVTKRQFCICVTK--AQRVLFKHPQCTEDMDY
IxToll-XP_002400887 TVIAMSLSLVACILEFTIYLKRWIHYIYSSLSKSAALLSS--AKSEVWVKFTNISQRDPSA
Clustal Consensus
-----PAMLTFDCKRPSRVLYGRRYRVFYPMPKAVTCANCH-----RLGHKFDICPTAV

```

```

1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480
RpToll-like-JAA59716.1  MALLNSLESNEE---KFKLCIHERDVLPG---YNISSWIVNSVQNSRRITLVVSKDFLESVWQF---VEFPTATYQMLD---
RmToll-like            MALLNSLESNEE---KFKLCIHERDVLPG---YNISSWIVNSVQNSRRITLVVSKDFLESVWQF---VEFPTATYQMLD---
IxToll1A-XP_002399580.1 MALLNSLESNEE---MFKLCIHERDVLPG---YNISSWIVNSVQNSRRITLVVSKDFLESVWQF---VEFPTATYQMLD---
DmToll1C-NC_001262995.1 MALLNSLESNEE---KFKLCIHERDVLPG---YNISSWIVNSVQNSRRITLVVSKDFLESVWQF---VEFPTATYQMLD---
DmToll1B-NP_524518.1   DVLVPLQLEHGQQ---KFKLCIHERDVLPG---GHIPEINMRSVADSRRTIIVLSQNFVKSSEWAR---LEFRAAHSALNE---
DmToll1D-NP_733166.1   DVLVPLQLEHGQQ---KFKLCIHERDVLPG---GHIPEINMRSVADSRRTIIVLSQNFVKSSEWAR---LEFRAAHSALNE---
DmTehao-NP_477438.1    -KLLVPLKLESGPH---PFRCLVDRDVLPG---DCIPEQIVRTVDDSKRVIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
AaToll-XP_001663801.1 NHIVPTLEQPPM---NFKTCWHVDRDVLPG---ELIPEQIVRTVDDSKRVIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
AaToll-XP_001658507.1 EHLVPTLEKEPM---NFKTCWHVDRDVLPG---ELIPEQIVRTVDDSKRVIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
AgToll-XP_309197       EHLVPTLEKEDPM---NFKTCWHVDRDVLPG---EMISSQISSVVEQSRRTIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
AgToll-AAL37901.1     EHLVPTLEKEDPM---NFKTCWHVDRDVLPG---EMISSQISSVVEQSRRTIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
AaToll-XP_001658496.1 EHLVPTLEKEDPM---NFKTCWHVDRDVLPG---EMISSQISSVVEQSRRTIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
AaToll-XP_001647905.1 STLVRLETAAPM---NFKTCWHVDRDVLPG---EMITQIVKSIENSRRTIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
AgToll-1like5-XP_560220.3 DQLLPRLESEEL---NFKTCWHVDRDVLPG---EMITQIVKSIENSRRTIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
AgToll-1like1A-XP_311355.3 KELLPKLESEEL---NFKTCWHVDRDVLPG---EMITQIVKSIENSRRTIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
DmToll14-NP_523519.2  EEFVDRLENGRP---KFKLCIHERDVLPG---ESIPEQIVRTVDDSKRVIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
DmMstProx-NP_649719.2 EEFVDRLENGRP---KFKLCIHERDVLPG---ESIPEQIVRTVDDSKRVIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
IxToll-XP_002406803   EHLVPRMEAHG---FTVCTYDRNFKGQ---FLIQDIIHEAVGSRRTIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
IxToll-XP_002406802   EQLIPIGVEAHG---FVCTYDRNFKGQ---FLIQDIIHEAVGSRRTIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
IxToll-XP_002406804   NELIPKIESHG---FSICTYDRNFKGQ---YLVQDIIHEAVGSRRTIIVLSQNFVKSSEWAR---MEFRTAHTSALQD---
RpToll-1like6-JAA63491.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
RmToll18-Like         QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
IxToll18-XP_002402229 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
IxToll-XP_002400628.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
AaToll-XP_001649808.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
AgToll-1like5-XP_320172.2 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
DmToll16-NP_524081.1  QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
DmToll10-NP_524757.1  QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
AaToll-XP_001649813.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
AaToll-XP_001660216.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
AaToll-XP_001648238.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
AaToll-XP_001655730.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
AgToll-1like7-XP_320221.4 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
DmToll17-NP_523797.1  QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
Dm18weeler-NP_476814.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
HsToll-1like7-NP_057646.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
HsToll-1like8-NP_619542.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
HsToll-1like9-NP_059138.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
HsToll-1like1-NP_003254.2 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
HsToll-1like6-NP_006059.2 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
HsToll-1like10-NP_112218.2 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
HsToll-1like2-NP_003255.2 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
AaToll-XP_001653990.1  QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
AaToll-XP_001650338.1  QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
HsToll-1like3-NP_003256.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
HsToll-1like4-NP_612564.1 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
HsToll-1like5-NP_003259.2 QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
DmToll19-NP_649214.1  QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
IxToll-XP_002400887   QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---
Clustal Consensus     QVLAAELETCSSGGKRRRLRLCLRHRLDVLPGVAAEAVVEAVQVSHRTVVVSEQFLRSSEWAR---FELKAA---QAS---

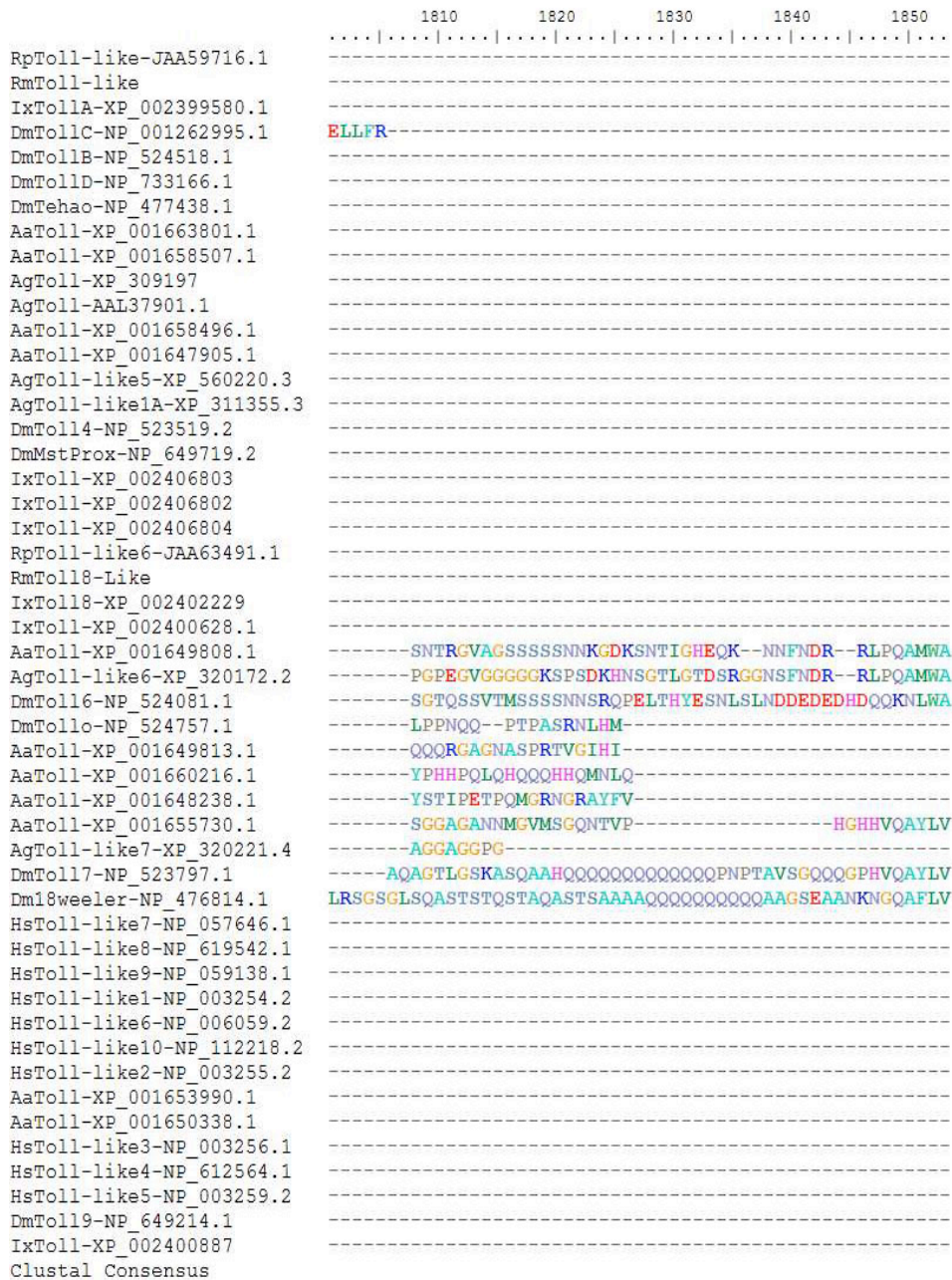
```

```

1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580
RpToll-like-JAA59716.1  --ETLDKELKFLTKTY--LIWGERWFFWEKLYAMPHRKQVPPPTNKLAMR---
RmToll-like            --ETLDKELKFLTKTY--LIWGERWFFWEKLYAMPHRKQVPPPTNKLAMR---
IxToll1A-XP_002399580.1 --ETLDKELKFLTKTY--LIWGERWFFWEKLYAMPHRKQVPPPTNKLAMR---
DmToll1C-NC_001262995.1 --ETLDKELKFLTKTY--LIWGERWFFWEKLYAMPHRKQVPPPTNKLAMR---
DmToll1B-NP_524518.1   --EKLDDELKAYLKMNTY--LKWGDPWFWDKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
DmToll1D-NP_733166.1   --EKLDDELKAYLKMNTY--LKWGDPWFWDKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
DmTehao-NP_477438.1    --NGIDSELRAYLKMNTY--LKWGDPWFWDKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
AaToll-XP_001663801.1  --EQLDADLKAYLKMNTY--IRWGDPFWFDKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
AaToll-XP_001658507.1  --EDLDPELKAYLKMNTY--VWGDQFDFWFDKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
AgToll-XP_309197       --YDLEPELRAYLHNTY---VRWGDPFWFDKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
AgToll-AAL37901.1     --YDLEPELRAYLHNTY---VRWGDPFWFDKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
AaToll-XP_001658496.1  --DSDCELKAYLKMNTY---VRWGDPFWFDKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
AaToll-XP_001647905.1  --DRIDSEMKAYLKMNTY---IKWGDPFWFDKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
AgToll-1like5-XP_560220.3 --DQLDPELRAYLKMNTY---VRWGDPFWFDKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
AgToll-1like1A-XP_311355.3 --EQLDPELQAYLKMNTY---VRWGDPFWFDKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
DmToll14-NP_523519.2  --DDLDSELRAYLKMNTY---LDRNPNFVNKMLYMPHSHLKRKRSDAE---
DmMstProx-NP_649719.2  --DSDSELRYMVFNTY---LERSHPNFVNKMLYMPHSHLKRKRSDAE---
IxToll-XP_002406803   --NAVDEELRYMVFNTY---LRWGEAHFWDKLLYSLEPKKQSRKVIPIVNSQ---
IxToll-XP_002406802   --GLVDEELQYMVFNTY---LRWGEAHFWDKLLYSLEPKKQSRKVIPIVNSQ---
IxToll-XP_002406804   --DAVDEELRRYMVFNTY---LRWGEAHFWDKLLYSLEPKKQSRKVIPIVNSQ---
RpToll-1like6-JAA63491.1 AQDQDQDVEARCCCLRSALI--LRWGERWFFWEKLYAMPHRKQVPPPTNKLAMR---
RmToll18-Like         VAVKEMDADARCCCLRSAVL--LRWGDKRFWEKLYAMPHRKQVPPPTNKLAMR---
IxToll18-XP_002402229  VSYKELDPELRLWKSSTF--LRWGEKRFWEKLYAMPDRTRH---
IxToll-XP_002400628.1  LPQRDLADMRLYLRTNCT--IEWDDKFFWQKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
AaToll-XP_001649808.1  LPQRDLADMRLYLRTNCT--IEWDDKFFWQKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
AgToll-1like5-XP_320172.2 LPQRDLADMRLYLRTNCT--IEWDDKFFWQKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
DmToll16-NP_524081.1  LPQRDLADMRLYLRTNCT--IEWDDKFFWQKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
DmToll10-NP_524757.1  VPQKELDPELRLYLKNTY--LWGDQKLFWEKLYAMPHRKQVPPPTNKLAMR---
AaToll-XP_001649813.1  VPQKELDPELRLYLKNTY--LWGDQKLFWEKLYAMPHRKQVPPPTNKLAMR---
AaToll-XP_001660216.1  QSMLTMDPIMDLTRCTV--ISWDDRRFWDKLRFALEHRRPVGNIGNGAL---
AaToll-XP_001648238.1  VELVAMPDPMNLLTRCTV--ACWGERKRFWEKLYAMPHRKQVPPPTNKLAMR---
AaToll-XP_001655730.1  ILEAENDVELVPLKPTTVN--RIKRSDRHFWEKLYAMPHRKQVPPPTNKLAMR---
AgToll-1like7-XP_320221.4 ILEAENDVELVPLKPTTVN--RVRSDRHFWKLYAMPHRKQVPPPTNKLAMR---
DmToll17-NP_523797.1  SAEAEDVAELSPYLKSPVSN--RLTCDRYFWEKLYAMPHRKQVPPPTNKLAMR---
Dm18weeler-NP_476814.1 QKSKFLQRLKRCSSVLEWPTNQAHPYFQWQCLKALADTNRVA---
HsToll-1like7-NP_057646.1 QHSQVLRRLRQICSSVLEWPTNQAHPYFQWQCLKALADTNRVA---
HsToll-1like8-NP_619542.1 RRSRVRLRQICSSVLEWPTNQAHPYFQWQCLKALADTNRVA---
HsToll-1like9-NP_059138.1 IPSSYHKLKALMARTYLEWPKKSKRFLWANLRAAINIKLEQAK---
HsToll-1like1-NP_003254.2 IPNKYHKLKALMARTYLEWPKKSKRFLWANLRAAINIKLEQAK---
HsToll-1like6-NP_006059.2 IPRYHKLKALMARTYLEWPKKSKRFLWANLRAAINIKLEQAK---
HsToll-1like10-NP_112218.2 IPRYHKLKALMARTYLEWPKKSKRFLWANLRAAINIKLEQAK---
HsToll-1like2-NP_003255.2 IPRYHKLKALMARTYLEWPKKSKRFLWANLRAAINIKLEQAK---
AaToll-XP_001653990.1  -----LQNIKRYLHLLH---LEMDPEMDNDEREGVYTTTBEYE---
AaToll-XP_001650338.1  EQIFNKNRSLKILNAGNALLQDILKTFGAEINLQILDQGNQLQM---
HsToll-1like3-NP_003256.1 LNHALCLRRMFKSHCINLWVQKERTGAPRHKLQVALGSKNSVH---
HsToll-1like4-NP_612564.1 LLRQQVELYRLSRLNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKLALDOKSWNPEGTG---
HsToll-1like5-NP_003259.2 QLMKHQSIKRFVQKQYLRWPEDLQVWFLHKLSSQILKGEKEGK---
DmToll19-NP_649214.1  --KRPKTQYLMDVKTYIHWPTAKEDRCLFWRKLRKLSVIGINSREISV---
IxToll-XP_002400887   --DDQRLQDQVQVQVDTPAATTSLEKAGIRMDNDHCVSP---
Clustal Consensus     --DDQRLQDQVQVQVDTPAATTSLEKAGIRMDNDHCVSP---

```





**Figura 6.** Alinhamento de múltiplas sequências utilizando o programa CLUSTAL W2 comparando as sequências de proteínas dos dois homólogos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (RmToll-like e RmToll8-like) e as isoformas de receptores Toll obtidas no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, *Drosophila melanogaster* (Dm), *Aedes aegypti* (Aa), *Ixodes scapularis* (Ix), *Homo sapiens* (Hs), *Anopheles gambiae* (Ag) e *Rhipicephalus pulchellus* (Rp).