

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

**TESE**

**Identificação e quantificação de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculados com fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium corylophilum* e *Fusarium oxysporum*.**

**Sandra Borges da Silva**

**2006**



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

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HEMÓCITOS DE  
FÊMEAS INGURGITADAS DE *Boophilus microplus* INOCULADOS  
COM FUNGOS *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium  
corylophilum* e *Fusarium oxysporum*.**

**SANDRA BORGES DA SILVA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Vânia R. E. Pinheiro Bittencourt**

*e Co-orientação dos Professores*  
**Maria Elisa Carneiro**  
**João Luiz Horácio Faccini**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor** em  
Ciências Veterinárias, Área de  
Concentração em Parasitologia  
Veterinária.

Seropédica, RJ.  
Fevereiro de 2006

595.42  
S586e  
T

Silva, Sandra Borges da, 1972-

Identificação e quantificação de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculados com fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium corylophilum* e *Fusarium oxysporum* / Sandra Borges da Silva. – 2006.

60f. : il.

Orientador: Vânia R. E. Pinheiro Bittencourt.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 50-57.

1. Carrapato – Controle biológico – Teses. 2. *Boophilus microplus* – Controle biológico – Teses. I. Bittencourt, Vânia R. E. Pinheiro. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. III. Título.

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

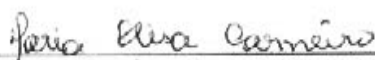
**SANDRA BORGES DA SILVA**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor** em Ciências Veterinárias.

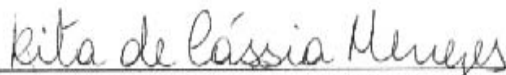
TESE APROVADA EM 24 / 02 /06



\_\_\_\_\_  
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. (Ph.D). UFRRJ  
(Orientadora)



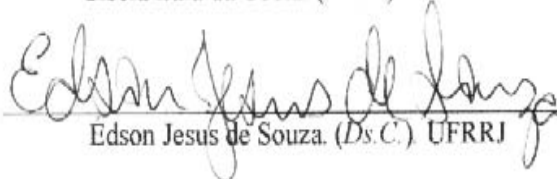
\_\_\_\_\_  
Maria Elisa Carneiro. (Ph.D). UNIPLAC  
(Co-Orientadora)



\_\_\_\_\_  
Rita de Cássia de Menezes. (Ph.D). UFRRJ



\_\_\_\_\_  
Gisela Lara da Costa. (Ph.D.) FIOCRUZ



\_\_\_\_\_  
Edson Jesus de Souza. (Ds.C.) UFRRJ

À minha família por seu amor e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

A professora Dr. Vânia R. E. Pinheiro Bittencourt pela orientação e amizade durante o período de convivência.

À amiga Maria Dalila Forlano Rieira pelo eterno bom humor, amizade, apoio e incentivo.

À amiga Débora Henrique da S. Anjos pela amizade, carinho, apoio e disposição em ajudar nos momentos difíceis, como também compartilhar os agradáveis.

Ao amigo Carlos Eugênio pela amizade, apoio e ajuda prestada durante a execução e finalização deste trabalho.

A minhas amigas Heloisa Helena, Valéria Castilho, Franzisca Huber, Denise Ribeiro de Melo e Rosana Colatino, pelo carinho e bons momentos compartilhados, amizade e carinho.

Aos colegas do laboratório e amigos do alojamento de pós-graduação da UFRRJ pelos momentos agradáveis compartilhados.

Aos professores do curso de pós-graduação que durante meu período de permanência nesta instituição estiveram sempre dispostos a ajudar, ensinar e estimular minha vida acadêmica.

Aos funcionários da secretaria do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias por seus inúmeros préstimos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	02
<b>2.1 <i>Boophilus microplus</i></b> .....	02
<b>2.2 Controle Microbiano</b> .....	03
<b>2.3 Mecanismo de Defesa dos Invertebrados</b> .....	04
<b>2.4 Imunidade Celular</b> .....	04
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	09
<b>3.1 Local de Execução do Experimento</b> .....	09
<b>3.2 Obtenção de Fêmeas Ingurgitadas</b> .....	09
<b>3.3 Obtenção dos Fungos</b> .....	09
<b>3.3.1 Quantificação dos inóculos</b> .....	10
<b>3.4 Bioensaios para Avaliação das Alterações Celulares da Hemolinfa de <i>B. microplus</i></b> .....	10
<b>3.4.1 Formação dos grupos de carrapatos para realização dos bioensaios</b> .....	10
<b>3.4.2 Coleta e coloração da hemolinfa</b> .....	10
<b>3.4.3 Identificação e quantificação de hemócitos</b> .....	11
<b>3.5 Análise Estatística</b> .....	11
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	12
<b>4.1 Hemolinfa</b> .....	12
<b>4.2 Morfologia dos Tipos Celulares Encontrados</b> .....	12
<b>4.2.1 Pró-hemócitos</b> .....	13
<b>4.2.2 Plasmatócitos</b> .....	13
<b>4.2.3 Granulócitos</b> .....	13
<b>4.2.4 Esferulócitos</b> .....	13
<b>4.2.5 Oenocitóides</b> .....	14
<b>4.2.6 Células não identificadas</b> .....	16
<b>4.3 Supressão de Hemócitos Circulantes</b> .....	18
<b>4.4 Percentual de Hemócitos Identificados nos Diferentes Tratamentos</b> .....	21

<b>4.5 Resposta Celular em Carrapatos Inoculados com Fungos não Entomopatogênicos (<i>Fusarium corylophilum</i> e <i>Penicillium oxysporum</i>).....</b>	<b>23</b>
4.5.1 Pró-hemócitos.....	23
4.5.2 Plasmatócitos.....	25
4.5.3 Granulócitos.....	27
4.5.4 Esferulócitos.....	29
4.5.5 Oenocitóides.....	31
4.5.6 Células não identificadas.....	33
<b>4.6 Resposta Celular em Carrapatos Inoculados com Fungos Entomopatogênicos (<i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>).....</b>	<b>35</b>
4.6.1 Pró-hemócitos.....	35
4.6.2 Plasmatócitos.....	37
4.6.3 Granulócitos.....	39
4.6.4 Esferulócitos.....	41
4.6.5 Oenocitóides.....	43
4.6.6 Células não identificadas.....	45
<b>4.7 Mortalidade de <i>B. microplus</i> e avaliação dos tipos celulares mais prevalentes identificados na hemolinfa.....</b>	<b>47</b>
<b>4.8 Considerações Gerais Sobre a Resposta Celular de <i>Boophilus microplus</i> sob Condição de Desafio.....</b>	<b>48</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número e percentual de hemócitos identificados na hemolinfa de grupos de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> inoculadas com fungos não entomopatogênicos ( <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium corylophilum</i> ), entomopatogênicos ( <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> ) e de grupos não inoculados com fungos.....	22
<b>Tabela 2</b> Média e desvio padrão de pró-hemócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Penicillium corylophilum</i> .....	24
<b>Tabela 3</b> Média e desvio padrão de plasmatócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Penicillium corylophilum</i> .....	26
<b>Tabela 4</b> Média e desvio padrão de granulócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Penicillium corylophilum</i> .....	28
<b>Tabela 5</b> Média e desvio padrão de esferulócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Penicillium corylophilum</i> .....	30
<b>Tabela 6</b> Média e desvio padrão de oenocitóides identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Penicillium corylophilum</i> .....	32
<b>Tabela 7.</b> Média e desvio padrão de células não identificadas na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Penicillium corylophilum</i> .....	34
<b>Tabela 8</b> Média e desvio padrão de pró-hemócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> .....	36
<b>Tabela 9</b> Média e desvio padrão de plasmatócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> .....	38
<b>Tabela 10.</b> Média e desvio padrão de granulócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> .....	40
<b>Tabela 11</b> Média e desvio padrão de esferulócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> .....	42

**Tabela 12** Média e desvio padrão de oenocitóides identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*..... 44

**Tabela 13** Média e desvio padrão de células não identificadas na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*..... 46

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Hemócitos identificados em hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* corada pelo Giemsa. (a) Pró-hemócitos; (b) plasmatócitos; (c) granulócitos; (d) esferulócitos; (e) oenocitóide; (—)= 10µm..... 14
- Figura 2.** Plasmatócitos com diferentes morfologias identificados em hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* corados pelo Giemsa. (a) células alongadas; (b) células arredondadas, (c) células piriformes com filopódios; (—)= 10µm..... 15
- Figura 3.** Hemócitos não identificados de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* corados pelo Giemsa. (a e b) processo de divisão celular, (c e d) aglomerado celular; (e) célula não identificada; (f) degranulação celular; (—)= 10µm..... 17
- Figura 4.** Desenvolvimento de hifas e presença de conídios de *M. anisopliae* na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* coradas pelo Giemsa. (a) hifas em desenvolvimento, (b) conídios e hifas; (—)= 10µm..... 20

## RESUMO

SILVA, Sandra Borges. **Identificação e quantificação de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculados com fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium corylophilum* e *Fusarium oxysporum*.** Seropédica: UFRRJ, 2006. 60 p. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias).

O controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* com a utilização de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* tem sido avaliado por diversos pesquisadores. A seleção de cepas resistentes é um mecanismo adotado pelos artrópodes para sobrevivência da espécie e sua manutenção no ambiente. Apesar de estar esclarecida a forma como o fungo penetra no hospedeiro e comprovada sua patogenicidade sobre diferentes fases de seu ciclo biológico, a sua resposta imune frente a estes agentes agressores necessita de maiores estudos. O presente trabalho teve como objetivo: identificar e quantificar os tipos celulares envolvidos na resposta imune celular de *B. microplus* inoculados com fungos entomopatogênicos não entomopatogênicos. Na experimentação foram utilizados 60 fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, representando seis tratamentos cada um contendo 10 espécimes. Para os grupos inoculados com fungos entomopatogênicos foi utilizada a suspensão aquosa dos fungos *Metarhizium anisopliae* (isolado Ma 959) e *Beauveria bassiana* (isolado Bb 986). Nos tratamentos com fungos não entomopatogênicos, *Penicillium corylophilum* e *Fusarium oxysporum*, foram formados ainda um grupo testemunha (não recebeu inoculação) e um grupo inoculado com solução de tween 80 a 0,1% em água destilada estéril, considerado controle negativo. Nos grupos dos tratamentos com suspensão fúngica ou solução a inoculação foi feita na região posterior do idiossoma do carrapato. As coletas de hemolinfa foram realizadas durante todo o período de vida dos espécimes, tendo início 24 horas após inoculação. As amostras de hemolinfa foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Em todos os períodos estudados, tanto nos espécimes inoculados com fungos como nos controles, foram observados pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e oenocitóides. Pró-hemócitos, plasmatócitos e esferulócitos foram às células mais numerosas na hemolinfa. Foi observada a ausência de hemócitos no grupo inoculado com *B. bassiana* 72 horas após a inoculação, como também a morte dos espécimes inoculados com fungos entomopatogênicos a partir deste período. A ausência de células evidencia o efeito imunossupressor do fungo sobre os carrapatos estudados. Característica não observada para *Metarhizium anisopliae*, mesmo tendo provocado acentuada mortalidade dos carrapatos. Os fungos não entomopatogênicos não afetaram de forma significativa o ciclo de vida destes carrapatos, sendo rapidamente eliminados do organismo.

**Palavras chave:** Resposta celular, controle biológico, carrapatos.

## ABSTRACT

SILVA, Sandra Borges. **Identification and quantification of hemocytes obtained from engorged females of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) inoculated with *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium corylophilum* and *Fusarium oxysporum*.** Seropédica: UFRRJ, 2006. 60 p. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias).

Biological control of the tick *Boophilus microplus* with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* has been evaluated by several researchers. The selection of specimens resistant to chemical products is a mechanism used by arthropods for survival and maintenance in the environment. It is already known how fungi penetrate the host and their pathogenic potential at different phases of their biological cycle, however, ticks' immune response against these agents need more detailed studies. The present work had as objectives: to identify and quantify the cellular types involved in the cellular response of *B. microplus* inoculated with entomopathogenic (*M. anisopliae* and *B. bassiana*) and non-entomopathogenic fungi (*Penicillium corylophilum* and *Fusarium oxysporum*). In this study 60 engorged females of *B. microplus* were used, representing six treatment groups with 10 specimens each. Ticks were inoculated with aqueous suspension of conidia. There were two control groups: in the first one ticks were inoculated with Tween 80 0,1% aqueous solution (negative control), in the second one ticks were not inoculated (testimony group). Fungi suspension or Tween 80 solution were applied in the back part of the idiosoma of the tick. The hemolymph samples were collected during the whole period of life of the specimens, beginning 24 hours after inoculation. The haemolymph samples were fixed in methanol and stained with Giemsa. In all studied periods, cells like pro-hemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes and oenocytoids were observed in the specimens of all groups. Pro-hemocytes, plasmatocytes and spherulocytes were the most numerous cells observed in the hemolymph. Hemocytes were absent in the group inoculated with *B. bassiana* 72 hours after inoculation. After this period, specimens inoculated with entomopathogenic fungi were dead. The absence of cells suggests the immune-suppressor effect of the fungi on this tick species. It was not observed when ticks were treated with *M. anisopliae* due to accentuated mortality caused by this fungus species. The non-entomopathogenic fungi did not affect the life cycle of this tick, being quickly eliminated of the organism. It was suggested based on the absence of conidia during sampling.

**Key words:** Cellular response, biological control, ticks.

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie de carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) é de ciclo homoxeno e se encontra amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais do mundo (WILLADSEN; JONGEJAN, 1999). Estando então todo o território brasileiro incluído em zona potencialmente favorável às infestações por *B. microplus*. Este parasito representa um risco para a produção de bovinos no Brasil pela sua capacidade de espoliação e transmissão de doenças para os seus hospedeiros.

Os danos diretos provocados pelo parasitismo por *B. microplus* estão relacionados com a desvalorização do couro, favorecimento de miíases cutâneas em consequência da picada, provocando prejuízos no mercado de peles, além do comprometimento do desenvolvimento dos animais. Em prejuízos indiretos podemos citar os gastos, inerentes ao controle destes ectoparasitos (HORN; ARTECHE, 1985).

No Brasil a medida de controle mais comumente utilizada é o uso de carrapaticidas químicos, entretanto, entre os problemas relacionados a esta prática está o da resistência dos carrapatos. A poluição do ambiente e resíduos nos produtos alimentícios de origem animal, principalmente na carne e no leite, são consequências da utilização indiscriminada destes produtos que também elevam o custo do controle. O uso inadequado destes carrapaticidas também tem sido associado a problemas de intoxicação de animais e / ou humanos (BULLMAN et al, 1996).

Devido aos efeitos indesejáveis e ao elevado custo do controle químico, tem-se dado uma maior atenção ao estudo do controle biológico, que juntamente com outras medidas profiláticas vem-se tornando uma alternativa viável e já vem sendo adotado, por diferentes setores principalmente na agricultura. Diversos organismos que apresentaram potencial no controle biológico de artrópodes de interesse econômico têm sido estudados, entre eles as bactérias, nematóides, vírus e fungos.

O uso dos fungos entomopatogênicos no controle de artrópodes tem recebido uma atenção especial. *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são os mais estudados e diferentes isolados têm sido testados em algumas espécies de carrapatos. Sua atuação sobre carrapatos tem sido comprovada tanto pela elevada mortalidade em *B. microplus*, como pelas alterações no ciclo biológico destes artrópodes atuando sobre as fases de ovo, larva e fêmeas ingurgitadas. Os principais efeitos tem sido observados através do comprometimento dos períodos de pré-postura, postura, incubação, eclosão, percentual de eclosão; índice de produção de ovos, além de promover a mortalidade das larvas.

A mesma patogenicidade destes agentes tem sido observada sobre outras espécies de carrapatos como *Amblyomma cajennense*, *A. variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. sanguineus* e *B. annulatus*.

A forma como os componentes celulares da hemolinfa de *B. microplus* reagem à invasão destes organismos ainda não foi avaliada e sendo esta uma importante informação para o conhecimento de possíveis formas de resistência destes artrópodes ao uso dos fungos como agentes de controle biológico, o presente trabalho teve por objetivos: Identificar e quantificar os tipos celulares envolvidos na resposta imune celular de *B. microplus* inoculados com fungos entomopatogênicos não entomopatogênicos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Boophilus microplus*

*Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), conhecido como carrapato do boi, é uma espécie de ciclo homoxeno pertencente ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida, superfamília Ixodoidea.

Este gênero possui ampla distribuição geográfica e é encontrado em áreas tropicais e subtropicais. Sua distribuição ocorreu juntamente com a do gado zebu pelas regiões do Sul da África, Oceania, Américas Central e do Sul, sendo adaptado perfeitamente as condições climáticas destas regiões (GONZALES, 2002). Acredita-se que o gênero *Boophilus* seja de origem asiática onde originalmente parasitava cervídeos e bovinos selvagens (HOOGSTRAAL, 1985).

O ciclo biológico de *B. microplus* é completado em aproximadamente 21 dias, passando pelos estádios de ovo, larva, ninfa e adultos e pode ser caracterizado em duas fases: a de vida livre e a parasitária. A fase de vida livre é iniciada quando as fêmeas ingurgitadas se desprendem do hospedeiro para realizar a postura no ambiente (GONZALES, 2002). Durante o período de postura, que leva de doze a quatorze dias, uma fêmea ingurgitada pode colocar entre 3000 a 4000 ovos (ALVARADO; GONZÁLES, 1979). Nesta etapa os carrapatos ficam susceptíveis às interferências climáticas e são afetados principalmente pela umidade e temperatura (GONZALES, 2002). As condições desfavoráveis a sua biologia podem provocar redução na eclosão das larvas e prolongamento das etapas do ciclo, contudo não chegam a interromper a fase de vida livre, característica observada em trabalhos realizados no interior de São Paulo por FARIAS et al. (1995).

Na fase parasitária o carrapato permanece sobre o hospedeiro de forma dependente, e é iniciada com a fixação das larvas infestantes no hospedeiro, culminando com a cópula dos adultos e ingurgitamento das fêmeas (GOMES, 1998; GONZALES, 1975).

*Boophilus microplus* é o principal vetor de agentes causadores de babesiose e anaplasmose, que provocam sérios prejuízos econômicos em rebanhos da Austrália, Américas Central e do Sul, bem como partes da Ásia e África. Esta espécie é considerada o principal problema veterinário em regiões tropicais e subtropicais (RODRÍGUEZ et al., 1995; CHIGAGURE et al., 2000).

Dentre os vários problemas causados pelo parasitismo por *B. microplus* para bovinocultura, podem ser citados os prejuízos devidos à desvalorização do couro e ao comprometimento da saúde animal, como favorecimento de miíases em consequência da picada e a transmissão de agentes infecciosos que acarretam o atraso no desenvolvimento dos animais, à queda da produção de carne e leite ou mesmo à morte (HORN; ARTECHE, 1985).

O controle de *B. microplus* no Brasil é realizado principalmente durante sua fase parasitária com a utilização de diferentes produtos químicos comerciais. Esses, muitas vezes, provocam uma mortalidade eficaz nos estádios em que o parasito se encontra sobre o animal, entretanto sua atividade sobre as larvas que estão no pasto é geralmente limitada (MONTEIRO et al., 1998). O uso destes produtos de forma indiscriminada está acarretando sérios problemas, relacionados a questões de meio ambiente, custos da

produção e principalmente o desenvolvimento de resistência parasitária (PENNA, 1990; GONZALES, 2002).

Atualmente além da vacinação e das técnicas de controle integrado, que incluem rotação de pastagens e seleção de animais resistentes, o controle biológico apresenta-se como uma alternativa promissora. Em relação aos Ixodídeos, a utilização de fungos entomopatogênicos como medida de controle tem sido testada em laboratórios e também a campo devido ao seu potencial agressor. A patogenicidade destes fungos tem sido constatada em *B. microplus* (CASTRO et al., 1997; CORREIA et al., 1998; FRAZZON et al., 2000; FERNANDES et al., 2004), *R. sanguineus* (BARBOSA et al., 1997), *R. appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* (KAAYA; GODWIN, 2000) e *A. cajennense* (REIS et al., 2001).

## 2.2 Controle Microbiano

O controle microbiano de artrópodes tem sido realizado com diferentes agentes biológicos como vírus, bactérias, protozoários, nematóides e fungos. Estes agentes têm sido empregados e testados no controle aos insetos das famílias Muscidae, Reduviidae e Culicidae e outros insetos e ácaros de importância na saúde pública (ALVES, 1998). Sendo os insetos, grupo mais profundamente estudado, Huxham et al. (1989a) verificaram que a invasão do fungo *M. anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 causava diminuição da resposta imune do inseto. Este fato tinha sido anteriormente observado por Prasertphon e Tanada (1968), com *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912.

Atualmente uma grande variedade de fungos patogênicos vem sendo estudada visando à determinação e avaliação de seu potencial de atuação sobre artrópodes, já que têm sido utilizados na agricultura em importantes programas implantados no continente Americano e muitos deles no Brasil com a utilização de *M. anisopliae* contra pragas da cana-de-açúcar e em pastagens, enquanto na Colômbia, é aplicado *B. bassiana* nas plantações de café (SOSA, 1999). Estas duas espécies possuem ampla distribuição geográfica (ALVES, 1998) e são as espécies mais estudadas no controle biológico de carrapatos (LIPA, 1971; ROBERTS; HUMBER, 1981; ALVES, 1998).

*Metarhizium anisopliae* ocasiona alterações em diferentes parâmetros biológicos da fase não parasitária em *B. microplus in vitro*, como constatado por Bittencourt et al. (1992, 1994a,b, 1995), que avaliou a atuação deste fungo sobre as fases de ovo, larva e fêmea ingurgitada.

O efeito patogênico foi reafirmado nos estudos realizados por Athayde et al. (2001) que observaram a ação deste fungo sobre *B. microplus* enfatizando seu potencial para o controle biológico desta espécie de carrapato. Patogenicidade semelhante foi observada em diversos estádios de *B. annulatus* testado com *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. flavoviridae* causando de 85 a 100% de mortalidade no período de 7 a 10 dias pós-tratamento de fêmeas ingurgitadas (GINDIN et al., 2001).

Além da mortalidade, redução da fecundidade e viabilidade de ovos provenientes de fêmeas infectadas foram observadas por Kaaya et al. (1996) em *R. appendiculatus* e *A. variegatum* infectados artificialmente com *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Em relação a *B. bassiana* também foi observada sua ação patogênica pela determinação da inviabilidade de ovos de *Ixodes ricinus* (BOYCEV; RIZVANOV, 1960).



### **2.3 Mecanismo de Defesa dos Invertebrados**

A permanência dos seres vivos no meio ambiente depende da sua capacidade de se defenderem das adversidades químicas, físicas e biológicas. Neste contexto o mecanismo de defesa dos invertebrados compreende uma ampla variedade de barreiras físicas, químicas, fisiológicas e comportamentais que dificultam o acesso do patógeno ao interior do artrópode (OMOTO; ALVES, 1998). Como barreira inicial podemos citar o tegumento, parede intestinal, membrana peritrófica, coagulação e produção de moléculas citotóxicas no momento da lesão (LAVINE; STRAND, 2002).

A cutícula que reveste o artrópode apresenta características estruturais e componentes químicos que atuam protegendo o artrópode do meio externo. Além disso, apresenta microorganismos saprófitos e substâncias antimicrobianas. A reação da fenoloxidase com produção de quinonas tóxicas intermediárias também tem importante papel na defesa do artrópode (HACKMAN, 1982).

Quando o agente patogênico consegue 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 (DUNN, 1986; GILLESPIE et al., 1997; OMOTO; ALVES, 1998; LAVINE; STRAND, 2002; LEVASHINA, 2004).

As reações celulares ou imunidade celular compreendem fagocitose, encapsulamento e nodulação e as reações humorais, pelos processos de produção e liberação de peptídeos antimicrobianos e reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, coagulação e melanização (FRANCHINI et al., 1995; MUTA; IWANAGA, 1996; PEREIRA et al., 2001; LAVINE; STRAND, 2002; LEVASHINA, 2004).

### **2.4 Imunidade Celular**

A resposta imune celular em invertebrados inclui mecanismos de defesa realizados com a participação de diferentes tipos celulares (LACKIE, 1988; LAVINE; STRAND, 2002; LEVASHINA, 2004). Essas células foram caracterizadas e identificadas em diferentes artrópodes, para isso foram utilizadas principalmente características morfológicas, funcionais e bioquímicas (BRINTON; BURGDORFER, 1971; GIANNOTTI; CAETANO, 1990; LOPEZ et al., 1997; CARNEIRO; DAEMON, 1996; 1997; 2001).

Na classe Insecta, os hemócitos foram classificados por Jones (1962) em nove tipos celulares: pró-hemócitos, granulócitos, esferulócitos, plasmatócitos, oenocitóides, coagulócitos, adipohemócitos, verminócitos e podócitos. Contudo, nem todos os tipos podem ser encontrados em um mesmo espécime, sendo pró-hemócitos, granulócitos, esferulócitos, plasmatócitos e oenocitóides mais comumente observados (TANADA; KAYA, 1993).

Os pró-hemócitos são células pequenas, compactas, arredondadas ou ovais com um núcleo central grande em relação ao citoplasma, que se apresenta homogêneo e livre de inclusões ou vacúolos (GIANNOTTI; CAETANO, 1990; TANADA; KAYA, 1993).

Os granulócitos são células compactas de tamanho variado, geralmente arredondada, com núcleo excêntrico relativamente pequeno em relação ao citoplasma que contém inúmeros grânulos. Nos insetos os granulócitos são considerados importantes, pois têm função de fagocitar corpos estranhos (WOODRING, 1985; SONENSHINE, 1991).

Os esferulócitos são células ovais ou arredondadas com núcleo pequeno. O citoplasma é caracterizado por apresentar esférulas grandes e arredondadas que

freqüentemente distendem a célula e deslocam seu núcleo lateralmente. Frequentemente, estas esférulas são encontradas livres, tanto *in vivo* quanto em amostras fixadas de hemolinfa. Estas células não apresentam mobilidade (TANADA; KAYA, 1993).

Plasmatócitos, células de formato irregular, podem apresentar prolongamentos na membrana conhecidos por filopódios ou pseudópodes. Apresenta núcleo pequeno em relação ao citoplasma que pode conter grânulos e vacúolos (DOLP, 1970; WOODRING, 1985).

Os oenocitóides também não possuem mobilidade e variam muito em tamanho e forma. Possuem um núcleo pequeno e excêntrico que às vezes são encontrados aos pares. Não são encontrados em todos os insetos. Estas células não possuem capacidade fagocitária, porém estão envolvidas na produção de melanina (GIANNOTTI; CAETANO, 1990).

Os coagulócitos são células pequenas e frágeis que estão envolvidas no processo de fagocitose, encapsulamento, formação de nódulo e coagulação. Apresentam citoplasma hialino e têm características de células oenocitóides e granulares (WOODRING, 1985).

Os adipohemócitos são células arredondadas ou ovais, geralmente com núcleo pequeno. Seu citoplasma é levemente acidófilo e às vezes bastante irregular e tem como característica a presença de gordura refringente. Estas células são geralmente imóveis, com citoplasma hialino e têm características de células oenocitóides e granulares (WOODRING, 1985; TANADA; KAYA, 1993).

Em Himenóptera Giannotti e Caetano (1990), classificando os tipos celulares em *Poliste lanio lanio*, identificaram seis tipos celulares básicos: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, adipohemócitos, esferulócitos e oenocitóides, além de verminócitos. Os pró-hemócitos, plasmatócitos e granulócitos foram encontrados em todos os estádios de desenvolvimento do inseto.

Kaaya e Ratcliffe (1982) ao estudarem os tipos morfológicos de seis diferentes gêneros de dípteros de importância médica identificaram sete tipos celulares: pró-hemócitos, plasmatócitos, trombocitóides, granulócitos, adipohemócitos, oenocitóides e células vermiformes de diferentes tamanhos. Porém, nem todos os tipos celulares foram detectados em todas as espécies.

Em *Simulium vittatum* por meio da utilização de microscopia ótica e eletrônica, foram identificados pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos e esferulócitos. Plasmatócitos e granulócitos contendo grânulos neutrofílicos e vermelhos, sendo que somente granulócitos exibiram atividade enzimática significativa. Contudo, tanto plasmatócitos como granulócitos foram considerados como as primeiras células fagocíticas (LUCKHART et al., 1992).

Nos triatomíneos foram identificados sete tipos celulares: pró-hemócitos, plasmatócitos, células granulares, cistócitos, oenocitóides, adipohemócitos e células gigantes. Dentre as células classificadas, apenas pró-hemócitos estavam presentes em todas as espécies analisadas, porém em números variáveis e algumas vezes contendo pequenos pseudópodes (AZAMBUJA et al., 1991).

Silva et al. (2000) avaliando a resposta imune de *Culex quinquefasciatus* infectados com *Candida albicans* identificaram pró-hemócitos, plasmatócitos, células granulares e oenocitóides além da presença de nódulos melanizados distribuídos em diferentes tecidos dos insetos, contudo não sendo possível a identificação das células nestes nódulos.

Apesar da caracterização funcional e morfológica dos hemócitos ser baseada principalmente na classe Insecta, acredita-se que os ixodídeos apresentem similaridade

em relação aos tipos celulares e respostas imunológicas desta classe. Na classe Arachnida a primeira descrição de hemócitos, foi realizada por Nordenskiöld (1905) em *I. reduvius*. Segundo Sonenshine (1991) nos carrapatos são encontrados geralmente cinco tipos celulares: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e oenocitóides.

Carneiro e Daemon (1996), baseando-se em características morfológicas determinaram os tipos celulares presentes na hemolinfa da larva e ninfa de *R. sanguineus* em diferentes períodos de alimentação. Nesse estudo foram observadas as seguintes células: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e oenocitóides. Os pró-hemócitos foram encontrados apenas em larvas e ninfas em todos os períodos analisados e os plasmatócitos apenas nas ninfas e em concentrações baixas. Os granulócitos, células mais abundantes, foram divididas em dois tipos: granulócitos I e II, sendo o tipo II raramente encontrado na hemolinfa. Também foram observados esferulócitos e oenocitóides, porém em baixas concentrações.

Em *A. cajennense* e *Haemaphysalis* sp. foram encontrados somente três tipos em cada espécime: pró-hemócitos, esferulócitos, plasmatócitos e granulócitos, pró-hemócitos, plasmatócitos, respectivamente (CARNEIRO; DAEMON, 2001).

Já em *Dermacentor andersoni stiles* foram observados quatro tipos celulares pró-hemócitos, esferulócitos, plasmatócitos e oenocitóides. Os pró-hemócitos foram as células que apresentaram as maiores frequências, enquanto que os esferulócitos foram os que apresentaram maiores números e foram divididos em quatro tipos baseados em sua morfologia. Plasmatócitos apresentam formas irregulares, sendo considerado o único tipo celular propenso à fagocitose tendo a função de fazer a retirada de microorganismos (BRINTON; BURGDORFER, 1971). Em *Ornithodoros moubata* foram identificados apenas granulócitos, plasmatócitos e esferulócitos (INOUE et al., 2001).

Ayaad et al. (2000) através da caracterização morfológica e ultraestrutural de inclusões citoplasmáticas identificaram em *B. annulatus*: plasmatócitos tipo I e II, células granulares e pró-hemócitos. Em *B. microplus*, os plasmatócitos e granulócitos são os tipos celulares mais importantes, pois estão envolvidos no processo de nodulação. Os plasmatócitos são as células mais abundantes e os principais responsáveis pelo processo de fagocitose (PEREIRA et al. 2001).

Segundo Horton e Ratcliffe (2003), o processo de fagocitose pode ocorrer na ausência de fatores de opsonização, contudo nos artrópodes ela é favorecida por lectinas plasmáticas e por componentes da cascata de fenoxidase. Os principais tipos celulares envolvidos na fagocitose são os plasmatócitos e as células granulares. Neste processo são englobados apenas os agentes patogênicos pequenos, enquanto os maiores ou mais numerosos são encapsulados ou imobilizados através da formação de um nódulo e posterior liberação de substâncias antimicrobianas (BOMAN; HULTMARK, 1987; LEVASHINA, 2004).

Nos invertebrados os hemócitos liberam substâncias químicas bactericidas como óxido nítrico, que atuam destruindo os organismos invasores durante o processo de fagocitose. Tanto a fagocitose como as liberações de agentes reativos de oxigênio ocorrem em tempos diferentes, sendo inicialmente observada a fagocitose de corpos estranhos (FRANCHINI et al., 1995). Ottaviani et al. (1995) acreditam que o processo de fagocitose e síntese de óxido nítrico estão estreitamente relacionados e ambos são muito importantes para o sistema de defesa dos invertebrados e identificação de corpos estranhos pelas células de defesa.

Segundo Balashov (1972) os diferentes números de hemócitos encontrados nas amostras de carrapatos podem ser parcialmente explicados pelo fato destas células

possuírem a capacidade de se tornarem imóveis ou se aderirem aos tecidos ou membranas adjacentes. Vários tipos de células são reconhecidos no corpo gorduroso e este se apresenta mais desenvolvido nos carrapatos alimentados que nos não alimentados. Característica também observada por Alves (1998) que além de citar a variação no número de hemócitos, relata a possível alteração na proporção entre as células associando este fato a uma produção de células específicas e a imobilização das mesmas durante o processo de formação de nódulo e cápsulas frente a um agente microbiano. Esta dinâmica nas populações de hemócitos é muito importante para o controle das infecções bacterianas (JOHNS et al., 1998).

Em insetos, a dinâmica na população de hemócitos foi demonstrada pelo estudo de Huxham et al. (1989a) ao avaliarem a ação de destruxinas A e B, um peptídeo liberado pelo fungo *M. anisopliae* sobre três espécies de insetos. Foram observadas uma diminuição acentuada no número de hemócitos circulantes, e também uma diminuição na capacidade de fagocitose dos plasmatócitos e na formação de nódulos. Em se tratando de destruxina E, foram constatadas degranulação celular e alterações estruturais nas membranas dos hemócitos, sem, contudo, ser capaz de ativar o mecanismo da fenoloxidase provocando uma inibição da resposta celular (CERENIUS et al., 1990). Uma resposta celular semelhante foi observada em *Spodoptera exigua* por Hung et al. (1993) quando inoculado com *B. bassiana* e *C. albicans*.

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 debelar a infecção.

Em ixodídeos, Johns et al. (1998) estudando a habilidade do carrapato *D. variabilis* para prevenir a infecção por bactérias, observaram que durante as primeiras 72 horas todos os carrapatos sobreviveram à inoculação com *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, apresentando uma resposta celular efetiva contra estes agentes. Foi observado um aumento significativo no número de células seis horas pós-inoculação. Entretanto quando inoculado com uma cepa B31 de *Borrelia burgdorferi*, a eliminação deste agente ocorreu em aproximadamente 24 horas após inoculação com um aumento no número de hemócitos uma hora após inoculação e mantendo-se elevado por até seis horas (JOHNS et al., 2000).

A fagocitose parece ser o primeiro mecanismo de controle de *B. burgdorferi* em *I. scapularis*, pois uma hora pós-inoculação as células já estavam associadas às bactérias e em torno de 24 horas apresentavam inúmeras células fragmentadas. Sob condições naturais a fagocitose ocorre de forma mais lenta, pois as bactérias em contato com intestino se apresentam em menores quantidades (JOHNS et al., 2001a).

Em relação à origem dos tipos celulares Yamashita e Iwabuchi (2001) através da observação da diferenciação e divisão celular mitótica em microculturas de hemócitos de *Bombyx mori* consideraram prohemócito uma célula “tronco”, ou seja, possui a capacidade de dar origem às outras células por divisão binária e posteriormente se diferenciar em outros tipos celulares como plasmatócitos, granulócitos, e esferulócitos, mantendo desta forma o equilíbrio. Em relação aos oenocitóides, não foi observada sua produção durante o estudo, levando o autor a acreditar em uma origem diferenciada dos outros tipos celulares, podendo ser determinada pela liberação de substância de órgãos hematopoiéticos.

Os plasmatócitos e esferulócitos seriam células diferenciadas terminais, enquanto que granulócitos seriam uma fase intermediária de esferulócitos (YAMASHITA; IWABUCHI, 2001). Esta mesma característica foi anteriormente

observada por Gupta e Sutherland (1966), sem, no entanto constatarem a diferenciação na fase de pró-hemócitos, célula também considerada por Arnold (1974) como precursora dos diferentes tipos celulares, contudo encontrada em pequena quantidade na maioria dos insetos.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Local de Execução do Experimento

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária - Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhem Otto Neitz (E.P.W.O. N), pertencente ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) localizada no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

### 3.2 Obtenção de Fêmeas Ingurgitadas

Para a execução do experimento, estabeleceu-se uma colônia de *B. microplus*, sendo estas fêmeas obtidas de bovinos naturalmente infestados e sem contato prévio pelo menos 30 dias com acaricidas químicos. Os espécimes foram coletados diretamente do chão, após seu desprendimento natural do hospedeiro e em seguida levados ao laboratório para a realização da limpeza da cutícula que consiste na imersão destas fêmeas em hipoclorito de sódio a 1%, durante 3 minutos e enxaguados em água destilada. Os espécimes identificados segundo descrição de Aragão e Fonseca (1961) foram distribuídos em placas de Petri estéreis e mantidos no Laboratório de Ixodologia da E.P.W.O.N., em câmara climatizada tipo B.O.D. a  $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , com umidade relativa  $\geq 80\%$ , para obtenção da massa de ovos. Dez dias após o início das posturas, a massa de ovos de todas as fêmeas foi pesada segundo Alvarado e Gonzales (1979), e armazenadas em volume de 600 mg de ovos em seringa descartável com capacidade para 20 ml.

Aproximadamente 15 dias após a eclosão das larvas, estas foram distribuídas ao longo da linha dorsal de um bovino. O bovino utilizado para a manutenção da colônia de *B. microplus* foi previamente tratado para endoparasitos e ectoparasitos, sendo mantido em baia individualizada, sem contato com outros animais ou pasto. Foi regularmente acompanhado através de esfregaço sanguíneo para observação de hemoparasitos e exames parasitológicos.

### 3.3 Obtenção dos Fungos

Durante o experimento foram utilizados dois grupos de fungos. O primeiro grupo foi constituído por fungos entomopatogênicos, representados por *Metarhizium anisopliae* (isolado Ma 959) e *Beauveria bassiana* (isolado Bb 986) mantidos no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária, UFRRJ.

O segundo grupo foi composto por fungos não entomopatogênicos, representados por *Penicillium corylophilum* e *Fusarium oxysporum*, doados pelo Departamento de Micologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz. Todas as cepas foram mantidas no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária, da UFRRJ.

### 3.3.1 Quantificação dos inóculos

Os fungos foram cultivados em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) e mantidos em câmara climatizada com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa superior a 80%. Aproximadamente 15 dias após a inoculação foi preparada a suspensão conidial através da raspagem dos conídios da superfície do meio com auxílio de uma espátula e colocados em um Becker graduado contendo 100 ml da solução tween 80 a 0,1%, em água destilada estéril (LUZ et al., 1998).

A quantificação dos conídios foi realizada em microscópio óptico utilizando os menores campos da câmara de Neubauer, que compreendiam uma área de  $0,0025 \text{ mm}^2$ . O número médio de conídios contados em 10 destes campos (n) foi multiplicado pelo fator fixo desse campo ( $n \times 4 \times 10^6$ ), calculado em função do seu volume, o que determina o número de conídios existentes na suspensão (ALVES; MORAES, 1998). Para todos os isolados utilizados a concentração utilizada foi de  $10^8$  conídios/ml.

## 3.4 Bioensaios para Avaliação das Alterações Celulares da Hemolinfa de *B. microplus*

### 3.4.1 Formação dos grupos de carrapatos para realização dos bioensaios

As fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* utilizadas para os bioensaios foram coletadas de infestação artificial em um bovino, após seu desprendimento natural. A unificação dos grupos foi obtida através da seleção de fêmeas ingurgitadas com peso variando de 38 a 40 mg.

Após limpeza da cutícula, foram formados seis grupos experimentais constituído por dez fêmeas para cada grupo: dois tratados com fungos entomopatogênicos (*M. anisopliae* e *B. bassiana*); dois com fungos não entomopatogênicos (*P. corylophilum* e *F. oxysporum*); um grupo controle negativo (água e tween 80) e um grupo testemunha (sem inoculação).

A inoculação de  $1 \mu\text{l}$  da suspensão fúngica e da solução placebo (controle negativo) foi realizada na região dorsal do idiossoma das fêmeas ingurgitadas, com o auxílio de uma microseringa Hamilton. Posteriormente, estas fêmeas foram fixadas em decúbito dorsal com fita adesiva em placas de Petri e mantidas em BOD, com temperatura de  $27^\circ \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$ .

### 3.4.2 Coleta e coloração da hemolinfa

Vinte e quatro horas após a inoculação, amostras de hemolinfa utilizadas para confecção dos esfregaços foram obtidas diariamente, a partir da secção da região distal do tarso de uma ou mais patas e da leve pressão sobre o corpo, com auxílio de tesoura e pinça de relojoeiro ou oftálmica (BURGDORFER, 1970).

Após a coleta em lâminas, a gota de hemolinfa foi seca ao ar, fixada em álcool metílico (P.A.), por 3 minutos e deixada em corante de Giemsa (proporção de 1:9 de solução Tampão Sorensen, pH 7,2) por 30 minutos. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de corante e secas ao ar.

### **3.4.3 Identificação e quantificação de hemócitos**

A visualização e contagem dos hemócitos presentes nas lâminas foram realizadas com auxílio de um microscópio binocular com uso de objetiva de 40x e ocular de 15x. A caracterização morfológica foi realizada com base nas descrições de Jones (1962), Dolp (1970), Carneiro e Daemon, (1996; 1997). A mensuração dos diferentes tipos celulares encontrados foi realizada utilizando uma ocular micrométrica 15x Carl Zeiss, acoplada ao microscópio ótico (Inahl M.B.E 215-TPS). Para a análise morfométrica foram avaliados os parâmetros relativos aos diâmetros menor (dm) e maior (DM) para cada tipo celular íntegro. Para a contagem foi estabelecido um número mínimo de cem células a serem identificadas até o terceiro dia após a inoculação, pois após este período não foi mais possível atingir este número estabelecido para a amostragem.

### **3.5 Análise Estatística**

Para a avaliação dos resultados obtidos na contagem diferencial de hemócitos, observados na hemolinfa de carrapatos nos diferentes grupos estudados, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, a nível de significância de 5%, seguido do teste de Dunn para comparação entre as médias. Os tipos celulares que apresentaram maior abundância foram ainda analisados através do teste de correlação linear simples e Teste Exato de Fisher do Coeficiente de Correlação.

Para a avaliação da mortalidade foram realizadas análises de variância (ANOVA) para avaliar as variações dentro de um mesmo tratamento e entre os tratamentos, em um nível de significância ( $p < 0,05$ ). A análise de variância foi seguida por aplicação do teste de Tukey para comparação entre as médias. A análise estatística estabelecida para os diferentes grupos só foi aplicada nas amostras coletadas até o momento em que havia o mesmo número de espécimes estudados.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Hemolinfa

A hemolinfa coletada dos constituintes do grupo testemunha, controle negativo e inoculados com fungos não entomopatogênicos apresentaram aspecto límpido e translúcido durante todo o período experimental, como também foi relatado por Sonenshine (1991). Entretanto, em espécimes inoculados com *M. anisopliae* a hemolinfa coletada a partir do sexto dia apresentou coloração avermelhada.

Segundo Woodring (1985) o plasma de artrópodes pode conter diferentes pigmentos em sua composição que podem conferir cor a hemolinfa, contudo normalmente apresenta coloração que pode variar de amarelo a âmbar; somente os insetos da família Chironomidae contém hemoglobina na sua hemolinfa e lhe confere a coloração avermelhada.

Como as fêmeas no presente estudo estavam ingurgitadas pode ter havido extravasamento do plasma ingerido para a cavidade celomática, sem, contudo ter ocorrido o rompimento da parede intestinal, pois não havia hemácias na amostras. Sabe-se que *B. microplus* não sintetiza o grupo heme, que conferiria cor avermelhada à hemolinfa, porém, ele pode ser adquirido pela degradação da hemoglobina, proveniente do sangue ingerido e que depois liga-se a lipoproteínas que a transportam do tubo digestivo para os tecidos do carrapato (MAYA-MONTEIRO et al, 2000).

Outras variações na coloração da hemolinfa de carrapatos foram observadas por Carneiro e Daemon (2001) e vão do âmbar, um dia após a ecdise, ao azul, nas amostras coletadas 20 dias após a ecdise, sendo causado pela presença de hemocianina. Além de pigmentos, o plasma pode conter proteínas, toxinas, lipídios, e outros componentes que sugerem o potencial do plasma como reservatório de nutrientes.

Estes metabólitos encontrados no plasma são mais rapidamente disponíveis que os encontrados no corpo gorduroso, entretanto, sua capacidade de armazenamento é mais limitada, sendo possível o armazenamento temporário de proteínas, dipeptídeos, toxinas, pigmentos e outros materiais (WOODRING et al., 1985).

### 4.2 Morfologia dos Tipos Celulares Encontrados

Durante o estudo foram identificados cinco tipos celulares principais nas amostras de hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*: prohemócito (PR), esferulócitos (ES), granulócitos (GR), plasmatócitos (PL) e oenocitóide (OE) (Figura 1).

Estes tipos celulares também foram observados em *R. sanguineus* (CARNEIRO; DAEMOM, 1997), não inoculados. Segundo Sonenshine (1991), os tipos celulares mais comuns em carrapatos são pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos e esferulócitos. Entretanto em *A. cajennense* e *Haemaphysalis* sp não foram observados granulócitos e esferulócitos, respectivamente (CARNEIRO; DAEMON, 2001).

Em *D. andersoni stiles* foram observadas células tipo pró-hemócitos, esferulócitos, plasmatócitos e oenocitóides (BRINTON; BURGDORFER, 1971), enquanto que em *Ornithodoros moubata* desafiados através da inoculação de partículas de poliestireno fluorescente foram identificados granulócitos, plasmatócitos e pró-hemócitos (INOUE et al., 2001). Com bases nestes resultados podemos constatar que

existe uma variação nos tipos celulares presentes entre as espécies de carrapatos, e essa variação nem sempre depende apenas do tipo de desafio imunológico ao qual o espécime foi submetido.

No presente experimento foram observados os mesmo tipos celulares nos grupos não inoculados e inoculado concordando com as observações feitas por Pereira et al. (2001) em *B. microplus*. Estes autores, entretanto, registraram apenas dois tipos celulares: plasmatócitos (os mais abundantes) e granulócitos.

#### **4.2.1 Pró-hemócitos**

Os pró-hemócitos observados, independente dos grupos inoculado ou testemunha, apresentaram tamanho de 6,9 x 7,0 µm a 12,2 x 12,5 µm, arredondados ou levemente ovais, com estreita camada de citoplasma basofílico, granulações e núcleo grande ocupando aproximadamente 70% do citoplasma (Figura 1 a).

Estas características foram observadas em *R. sanguineus* e outros carrapatos.(CARNEIRO; DAEMON, 1996, DOLP, 1970) e também em representantes da classe Insecta (GIANNOTTI; CAETANO, 1990; LUCKHART et al., 1992, TANADA; KAYA, 1993).

#### **4.2.2 Plasmatócitos**

Plasmatócitos apresentaram-se arredondados, alongados ou piriformes, com tamanho variados 12 x 14,4 µm a 19,6 x 27,6 µm, núcleos geralmente centrais, envolvidos por uma ampla camada de citoplasma (Figura 1b). Algumas células apresentaram prolongamentos citoplasmáticos denominados pseudópodes ou filopódios. Esta estrutura morfológica característica de plasmatócitos também foi observada por Takle e Lackie (1986), os quais associaram ao grau de mobilidade celular. Este tipo de prolongamento só foi observado nos grupos inoculados e pode ser associado ao processo de fagocitose durante a fase de captura de um corpo estranho (Figura 2).

Plasmatócitos alongados foram encontrados, principalmente, nos grupos inoculados com fungos não entomopatogênicos (Figura 2 a) e plasmatócitos esféricos nos grupos inoculados com fungos entomopatogênicos (Figura 2 b).

#### **4.2.3 Granulócitos**

Estas células se apresentaram com formas arredondadas ou ovóides, de tamanho variando de 10,8 x 9,36 µm a 19,68 x 18 µm, núcleo fortemente eosinofílico, e envolvido por um grande volume de citoplasma acidofílico com granulações (Figura 1c). Em *Atta laevigata* (Formicidae: Myrmicinae) este tipo celular também apresenta projeções citoplasmáticas (GIANNOTTI; CAETANO, 1985), porém esta característica não foi observada no presente trabalho.

#### **4.2.4 Esferulócitos**

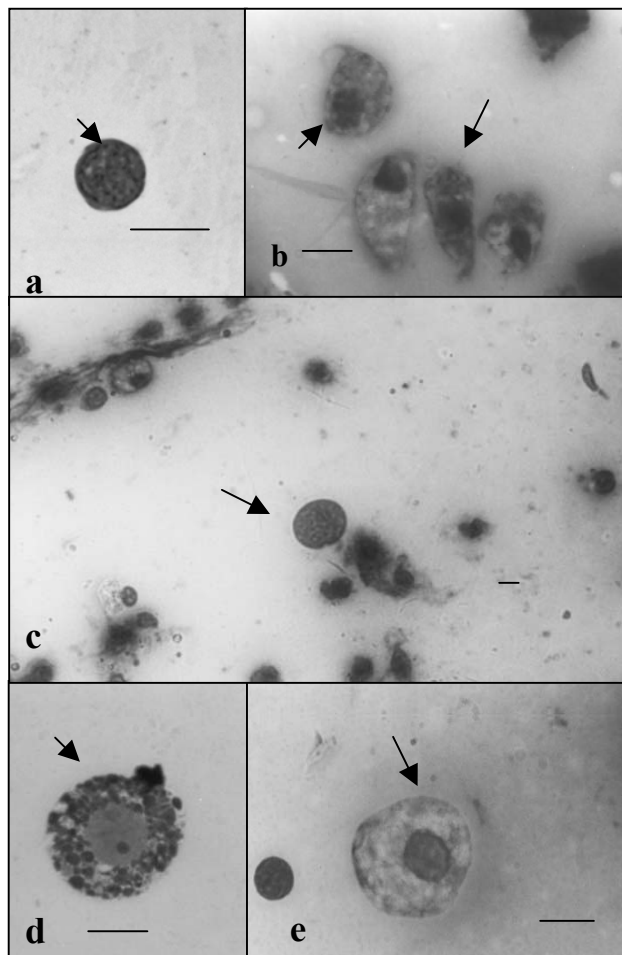
São células de tamanho 16,1 x 16,8 µm a 19,7 x 25,9 µm e forma variável (alongada ou arredondada), caracterizada por possuir grandes esférulas basofílicas, com diferentes afinidades pelo corante. Algumas células podem apresentar vacúolos no citoplasma (Figura 1d). Na literatura esta célula é subdivida de acordo com o número de esferas observadas. As esférulas destas células também foram observadas dispersas na

hemolinfa de carrapatos inoculados com fungos não entomopatogênicos e entomopatogênicos, o que caracteriza o processo de degranulação celular (Figura 3).

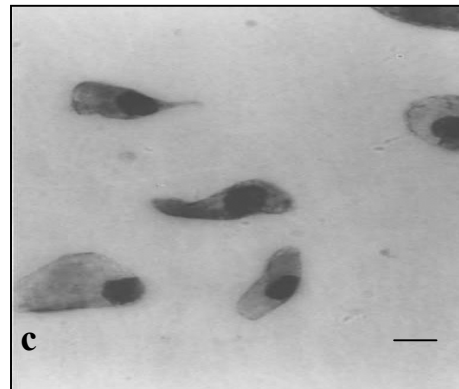
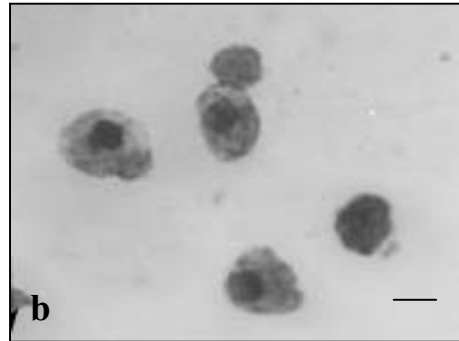
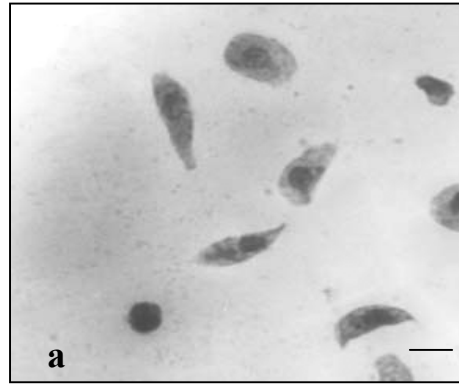
#### 4.2.5 Oenocitóides

Foram as células menos freqüentes nas amostras de hemolinfa dos carrapatos de todos os grupos. Caracterizaram-se por serem grandes  $12,0 \times 16,8 \mu\text{m}$  a  $30,7 \times 33,4 \mu\text{m}$ , arredondadas, com núcleo excêntrico na maioria das vezes e citoplasma apresentando pequenas granulações (Figura 1 e).

Estas células são importantes por apresentarem substâncias precursoras da fenoloxidase que possui um importante papel na melanização da hemolinfa. Segundo Woodring (1985) estas células se rompem facilmente quando em contato com partículas estranhas ou superfícies o que pode ser responsável pela baixa freqüência com que estas células foram observadas durante este estudo independente dos tratamentos.



**Figura 1.** Hemócitos identificados em hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* corada pelo Giemsa. (a) Pró-hemócitos; (b) plasmatócitos; (c) granulócitos; (d) esferulócitos; (e) oenocitóide; (—)=  $10\mu\text{m}$ .



**Figura 2.** Plasmatócitos com diferentes morfologias identificados em hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* corados pelo Giemsa. (a) células alongadas; (b) células arredondadas, (c) células piriformes com filopódios; (—)= 10 $\mu$ m.

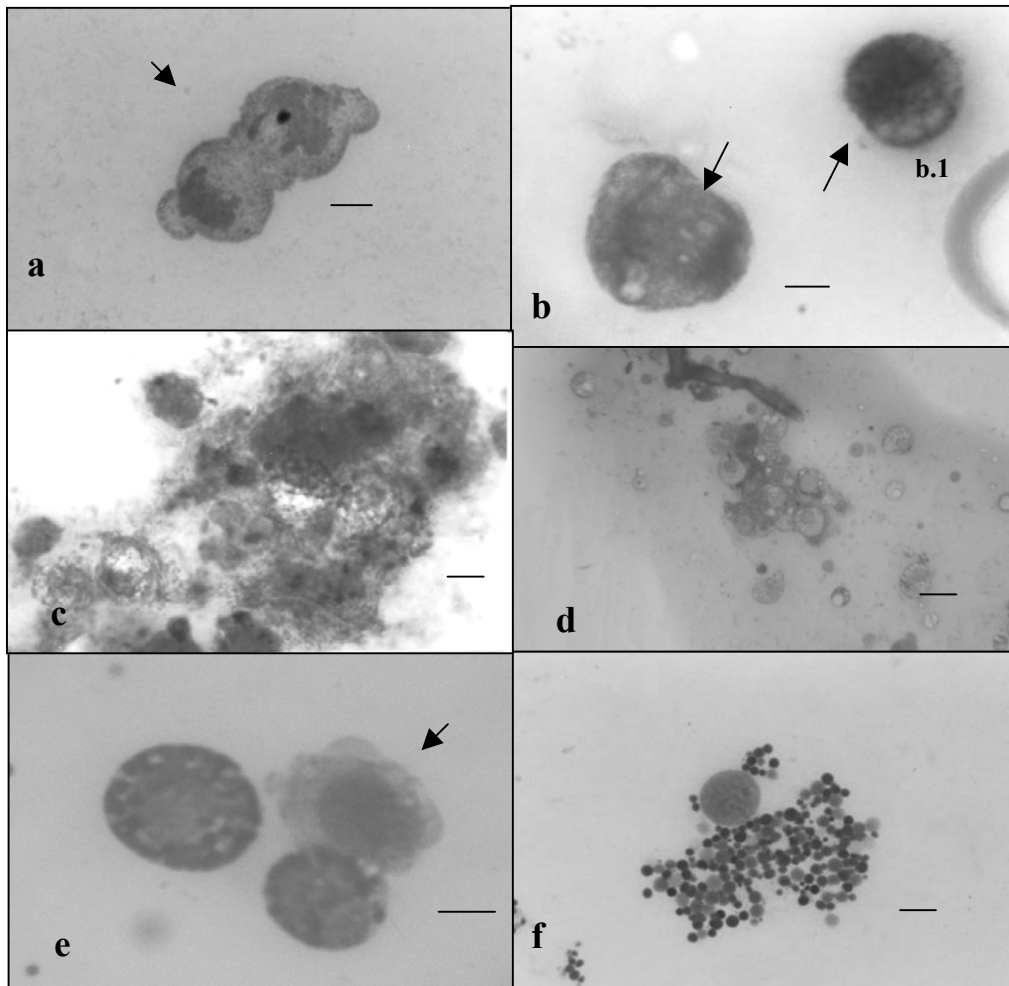
#### 4.2.6 Células não identificadas

A presença de células degranuladas foi uma constante nos tratamentos inoculados durante todo o período de avaliação. Este fato comprometeu uma identificação precisa destas células, apesar de serem indicativas de esferulócitos devido ao tamanho e coloração dos grânulos (Figura 3f). Este tipo de alteração foi observado principalmente nas amostras inoculadas com fungos entomopatogênicos.

Durante as avaliações dos tipos celulares realizadas nos diferentes tratamentos, além das células degranuladas não serem passíveis de identificação, outras células intactas apresentaram características intermediárias dos diferentes tipos celulares o que também dificultou sua identificação. Foram encontradas também células degeneradas ou contidas em aglomerados celulares, algumas apresentavam aspecto hialino ou mesmo escuras (Figura 3a, b, c, d).

O processo de degranulação é indicativo de uma resposta celular severa e imediata, muito importante para ativação da cascata de profenoloxidase. Situação semelhante foi observada por Hung et al. (1993) com degranulação celular em amostras de hemolinfa de *Spodoptera exigua* inoculadas com *B. bassiana* 24 horas após inoculação, entretanto o processo de fagocitose foi inibido, bem como o de formação de nódulos que é uma das fases do mecanismo de defesa dos invertebrados. Cerenius et al. (1990) também observaram degranulação celular ao inocularem *M. anisopliae* em *Pacifastacus leniusculus* (lagosta) tendo sido este processo associado a produção da toxina destruxina E. Neste caso também foi constatada, além da degranulação celular, alterações estruturais nas membranas dos hemócitos, sem, contudo, ter ocorrido a ativação do mecanismo da fenoloxidase e conseqüentemente inibindo a resposta celular contra este patógeno

Resultado semelhante foi observado por Carneiro e Daemon (1996) em larvas e ninfas de *R. sanguineus*, sendo que neste trabalho o sistema imune dessa espécie de carrapato não foi desafiado. Este processo de degradação celular é um mecanismo importante para a ativação de reações de defesa nos artrópodes e uma tentativa do organismo em controlar e eliminar a infecção (CERENIUS et al., 1990; TANADA; KAYA, 1993).



**Figura 3.** Hemócitos não identificados de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* corados pelo Giemsa. (a e b) processo de divisão celular, (c e d) aglomerado celular; (e) célula não identificada; (f) degranulação celular; (—)= 10µm.

### 4.3 Supressão de Hemócitos Circulantes

A ausência de hemócitos foi constatada em algumas amostras de hemolinfa coletadas 72 horas após inoculação nos grupos tratados com fungos entomopatogênicos, principalmente no grupo inoculado com *B. bassiana*. Carneiro e Daemon (1999) observaram comportamento semelhante em *R. sanguineus* em relação ao ausência de células, salientando que estes espécimes não foram submetido a tratamentos com fungos e sim a três diferentes temperaturas durante seu desenvolvimento, sendo observada a ausência de células ocorreu somente a 18°C.

Segundo Balashov (1972) os hemócitos ficam geralmente aderidos às paredes dos tecidos e são posteriormente liberadas na hemolinfa. No presente trabalho, houve casos de amostras negativas com subsequente liberação de um número acentuado de células, provocando aumento repentino no número de células circulantes. Este evento sugere que após um aparente esgotamento celular na hemolinfa houve recrutamento de células de defesa em resposta a presença dos fungos que apresentam reconhecida ação entomopatogênica.

Outra possibilidade para a ausência temporária de células na hemolinfa é a mobilização destas para formação de cápsulas ou nódulos que ficam aderidos à parede dos órgãos e em diferentes tecidos (CROSSLEY, 1975; DUNN, 1986; TANADA; KAYA, 1993), entretanto para confirmação de tal inferência seria necessária a dissecação dos espécimes, o que não foi possível pela necessidade de acompanhamento da dinâmica celular durante o período de vida dos espécimes estudados.

Nas amostras inoculadas com *B. bassiana*, foi observada diminuição contínua e drástica de todos os tipos de hemócitos até sua completa ausência, sugerindo que a presença deste patógeno induziu a supressão da resposta de defesa celular em *B. microplus*.

*Metarhizium anisopliae* também é conhecido por inibir a resposta imune em insetos devido a produção da toxina Destruixina (HUXHAM, et al., 1989a; CERENIUS et al., 1990; XIA et al., 2000). Esta toxina provoca um esgotamento seletivo na população de células de defesa, afetando também a capacidade de fagocitose pelos plasmatócitos. Huxham et al, (1989 a e b) estudando o comportamento celular em três espécies de insetos inoculados com *M. anisopliae* observaram a completa falência do sistema imune, a qual os autores relacionaram com a inibição da atividade celular.

Em invertebrados existe um único registro de inibição da resposta celular provocado por *B. bassiana* (HUNG et al., 1993). Neste caso, a inibição da atividade fagocitária também foi observada, embora Dresner (1950) relate que durante a germinação dos esporos de *B. bassiana* ocorre a produção e liberação de uma toxina que provoca paralisia em mosca adulta antes mesmo das hifas penetrarem no corpo do inseto.

Durante caracterização microscópica da resposta celular em hemolinfa de carrapatos inoculados com fungos entomopatogênicos foi observado que os fungos começaram a surgir na hemolinfa 72 horas após a inoculação (Figura 4a). Na coleta de amostra no período de 24 horas após a inoculação a hemolinfa se apresentava livre de conídios, mesmo não tendo sido encontradas células em processo de fagocitose. Este mecanismo parece ter sido ativado logo após a inoculação culminando com a retenção temporária da forma circulante de *B. bassiana*.

O fato do fungo não ser encontrado nas primeiras coletas pode ter ocorrido devido ao fato dos conídios terem sido fagocitados, porém não destruídos como observado previamente por Hung et al (1993). Contudo a partir do segundo e terceiro dias após a inoculação foram observados o aumento do número de conídios germinados e crescimento progressivo das hifas na hemolinfa juntamente com uma redução significativa do número de hemócitos circulantes.

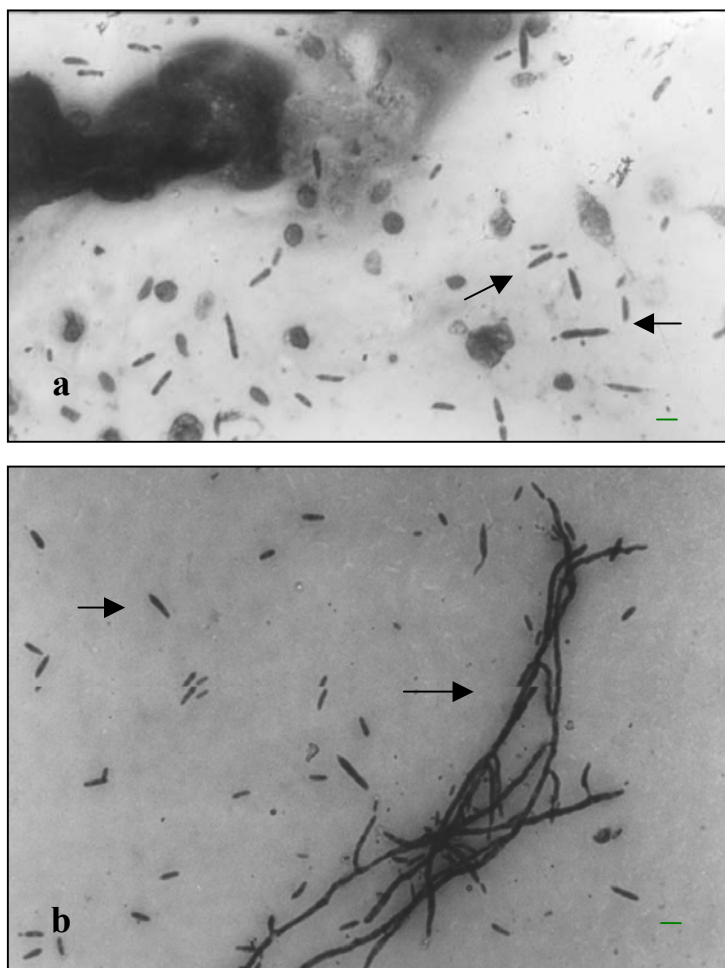
Esta situação não foi observada para *M. anisopliae*, pois apesar de hifas terem sido encontradas na hemolinfa (Figura 4b), sua presença não interferiu de forma acentuada no número dos hemócitos. David e Weiser (1994) observaram situação semelhante na inoculação de microsporídios em larvas de *Galleria mellonella*, pois, embora este protozoário tenha sido fagocitado e retirado da circulação, não houve destruição por parte dos fagócitos, propiciando a continuidade da infecção.

O tempo necessário para a retirada de corpos estranhos da hemolinfa vai depender do agente infeccioso, como também do artrópode estudado. Estudos *in vitro* com incubação de *B. burgdorferi* em hemolinfa, em duas espécies de carrapatos, demonstrou que *I. ricinus* necessita de um tempo maior para a retirada desta bactéria da hemolinfa, enquanto que *Dermacentor variabilis* responde rapidamente através do aumento do número de células fagocíticas retirando-as de circulação (JOHNS, 2001a).

Já no caso de fungos, a retirada completa de conídios circulantes da hemolinfa ocorreu em 24 horas após a inoculação de *B. bassiana* em *Spodoptera exigua*. Hung et al. (1993) observaram que estes conídios foram imediatamente reconhecidos como corpos estranhos pelo organismo e foram fagocitados pelos granulócitos e plasmatócitos circulantes na tentativa de conter o processo infeccioso, entretanto dentro destas células eles produziram tubos germinativos que produziram hifas crescendo para fora destas células sendo detectadas após um período de dois dias.

Os carrapatos tratados com *B. bassiana* sobreviveram por um período aproximado de três a quatro dias, enquanto que o grupo testemunha continuou vivo por um período de vinte dias. Os carrapatos que foram inoculados com água também apresentaram um período de sobrevivência semelhante, que pode ser justificado pela metodologia de tratamento, pois provoca uma lesão na cutícula predispondo a uma infecção. Entretanto, os grupos inoculados com *F. oxysporum* e *P. corylophilum* sobreviveram por aproximadamente treze dias. Para os espécimes inoculados com *M. anisopliae* foi observado uma mortalidade de 100% no décimo dia após a inoculação. Bittencourt et al (1995) testaram *M. anisopliae* em *B. microplus* e observaram mortalidade precoce, com presença de hifas na hemolinfa, a partir do segundo dia de coleta e as fêmeas mortas apresentavam escurecimento da cutícula com posterior ressecamento.





**Figura 4.** Desenvolvimento de hifas e presença de conídios de *M. anisopliae* na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* coradas pelo Giemsa. (a) hifas em desenvolvimento, (b) conídios e hifas; (—)= 10 $\mu$ m.

#### 4.4 Percentual de Hemócitos Identificados nos Diferentes Grupos de *B. microplus* Estudados

Dentre os tipos celulares encontrados em todos os grupos avaliados os plasmatócitos apresentaram o maior percentual (32,79% a 55,66%), seguidos pelos esferulócitos (14,47% a 34,33%), exceto no caso do grupo tratado com *B. bassiana* (9,90%), neste grupo os granulócitos atingiram o segundo maior percentual (22,37%).

O terceiro maior percentual observado nos outros grupos foi representado pelos granulócitos, inclusive nos grupos testemunha (5,50%) e controle negativo (7,93%). Os oenocitóides apresentaram o menor percentual em todos os grupos estudados, não havendo relatos sobre a porcentagem deste tipo celular em *B. microplus*, o que dificulta a comparação deste resultado. Em fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*, os oenocitóides também foram encontrados em baixos percentuais (CARNEIRO, 1995) (Tabela 1).

O percentual dos tipos celulares dos grupos testemunha e controle negativo do presente estudo foram semelhantes ao observado em insetos por Arnold (1974), Gupta (1979), Boman e Hultmark (1987), Luckhart (1992), sugerindo uma semelhança na estrutura das populações de hemócitos dos artrópodes. A semelhança em relação ao percentual dos plasmatócitos e esferulócitos também foi observada por Dolp (1970) em quatro espécies de carrapatos (*Hyalomma anatolicum excavatum*, *H. dromedarii*, *Argas (Persicargas) persicus* e *A. (Persicargas) arboreus*, porém deve-se considerar que o autor observou apenas hemócitos dos tipos pró-hemócito, plasmatócito e esferulócito.

O elevado percentual de células não identificadas nos grupos tratados com suspensões fúngicas, em relação a testemunha e controle negativo (Tabela 1) pode ser atribuído à presença de células em processo degenerativo e/ou alterações morfológicas devido ao processo de resposta celular.

**Tabela 1.** Número (Percentual) de hemócitos identificados na hemolinfa de grupos de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculadas com fungos não entomopatogênicos (*Fusarium oxysporum*, *Penicillium corylophilum*), entomopatogênicos (*Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*) e de grupos não inoculados com fungos.

Tipos celulares	Grupos não inoculados com fungos		Grupos inoculados com fungos não entomopatogênicos		Grupos inoculados com fungos entomopatogênicos	
	Testemunha N° (%)	Controle negativo N° (%)	<i>F. oxysporum</i> N° (%)	<i>P. corylophilum</i> N° (%)	<i>M. anisopliae</i> N° (%)	<i>B. bassiana</i> N° (%)
Pró-hemócitos	389 (3,74)	401 (4,06)	219 (3,45)	236 (3,82)	274 (4,66)	229 (16,08)
Plasmatócitos	5299 (50,88)	5772 (55,42)	3155 (49,67)	3133 (50,75)	3270 (55,66)	467 (32,79)
Esferulócitos	3575 (34,33)	2730 (27,65)	1987 (31,28)	17 (28,09)	850 (14,47)	141 (9,90)
Oenocitóides	31 (0,30)	14 (0,14)	13 (0,20)	14 (0,23)	16 (0,27)	9 (0,63)
Granulócitos	573 (5,50)	783 (7,93)	398 (6,27)	396 (6,42)	729 (12,41)	290 (20,37)
Não identificadas	547 (5,25)	473 (4,79)	580 (9,13)	660 (10,69)	736 (12,53)	288 (20,22)
<b>Total</b>	<b>10414 (100)</b>	<b>9873 (100)</b>	<b>6352 (100)</b>	<b>6173 (100)</b>	<b>5875 (100)</b>	<b>1424 (100)</b>

## **4.5 Resposta Celular em Carrapatos Inoculados com Fungos Não Entomopatogênicos (*Penicillium corylophilum* e *Fusarium oxysporum*)**

### **4.5.1. Pró-hemócitos**

As médias dos pró-hemócitos da hemolinfa em todos os grupos oscilaram durante o período de análise. No entanto, os grupos tratados com *P. corylophilum* e *F. oxysporum* não apresentaram diferença significativa entre si, controle e placebo, bem como os dias de coleta. Estas células não foram abundantes, apresentando uma amplitude de variação do número de células de zero a  $2,30 \pm 2,45$  para *P. corylophilum* e de zero a  $5,10 \pm 6,85$  para *F. oxysporum* (Tabela 2).

O baixo número de pró-hemócitos encontrados no presente estudo corrobora as afirmações de Hung et al. (1993) e Carneiro (1995) ao caracterizar hemócitos de *R. sanguineus* adultos, pois acredita-se que o número reduzido destas células na hemolinfa ocorra devido a sua diferenciação em outros tipos celulares de acordo com a necessidade do organismo.

**Tabela 2.** Média e desvio padrão de pró-hemócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com *Fusarium oxysporum* e *Penicillium corylophilum*.

Coletas	Testemunha	Controle negativo	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. corylophilum</i>
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
1	3,60 ± 3,20 ABa	8,40± 4,58 Aa	3,70± 4,95 Aa	3,80± 3,29 Aa
2	5,80± 6,37 ABa	4,20± 3,68 Aa	5,60± 3,60 A	1,90± 2,18 Aa
3	9,10± 6,42 ABa	8,20± 5,67 Aa	2,30± 2,45 Aa	5,10± 6,85 Aa
4	10,00± 4,48 Aa	8,90± 6,24 Aa	3,80± 4,02 Aa	3,70± 4,69 Aa
5	1,30± 1,83 Ba	1,00±1,49 Aa	2,10± 3,25 Aa	2,70± 3,74 Aa
6	1,30± 1,49 Ba	1,80± 1, Aa	0,60± 1,07 Aa	1,50± 2,59 Aa
7	0,00± 0,00	0,80± 1,40	0,50± 1,08	2,00± 2,98
8	0,40± 0,97	0,60± 0,97	0,20± 0,63	0,00± 0,00
9	0,60± 1,35	0,90± 1,20	1,00± 1,33	0,86± 1,86
10	1,90± 4,07	0,90± 1,29	0,88± 2,47	0,29± 0,76
11	0,60± 0,84	1,40± 1,84	0,50± 1,22	0,00± 0,00
12	0,67 ± 1,41	1,10± 1,73	1,33± 2,42	1,50± 1,38
13	3,44± 7,81	0,40± 0,84	0,00	0,00
14	0,44± 1,33	1,25±1,75	0,00	-

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna. Letras minúsculas referem-se a análise entre as colunas. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis  $p > 0,05$ ). (-)= ausência de coleta, devido a morte dos espécimes.

#### 4.5.2 Plasmatócitos

O número dos plasmatócitos na hemolinfa dos grupos inoculados com *F. oxysporum* e *P. corylophilum* apresentaram oscilações entre os diferentes dias de análise (Tabela 3), o que pode ser associado com a formação de nódulos, conforme observado por Crossley (1975).

A média dos plasmatócitos, no grupo testemunha, apresentou uma diminuição progressiva até o quinto dia de coleta, apresentando um pico no sexto dia após inoculação. Entre o 6º e o 9º dia observou-se oscilação nos valores médios seguido por aumento constante até valor máximo observado no 11º dia após inoculação e finalmente a partir deste, decresceu até ao 14º dia. A avaliação dos plasmatócitos neste grupo, assim como os do controle negativo, foram finalizados no 15º dia, devido à morte dos carrapatos no dia posterior. A dinâmica deste tipo celular apresentou amplitude de média de  $51,90 \pm 15,42$  a  $25,50 \pm 22,15$ , não sendo significativa (Tabela 3).

No grupo controle negativo foi observada semelhante dinâmica entre as células, apresentando oscilações entre os dias, sem, contudo apresentar diferenças significativas entre os grupos. Este grupo apresentou amplitude de  $21 \pm 25,25$  a  $58,50 \pm 23,43$  (Tabela 3).

A média dos plasmatócitos dos grupos tratados com *F. oxysporum* e *P. corylophilum* não diferiram significativamente do controle, em todo período avaliado, no entanto, observou-se diferença significativa entre o grupo tratado com *F. oxysporum* e o controle negativo, somente no 2º dia após inoculação. Mas apesar de não ter apresentado diferença estatística, nos demais dias, as médias deste tipo celular na hemolinfa dos carrapatos tratados com estes fungos foram inferiores na maioria dos dias de observação em relação a testemunha e ao controle negativo. Este fato pode ser atribuído à resposta celular, devido ao seqüestro destas células, para formação de nódulos nos tecidos e órgão, tendo por finalidade isolar o agente invasor, pois, não foram observados conídios e hifas livres na hemolinfa. A confirmação da presença destes nódulos nos diferentes tecidos não foi realizada no presente estudo (Tabela 3).

**Tabela 3.** Média e desvio padrão de plasmatócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com *Fusarium oxysporum* e *Penicillium corylophilum*.

Coletas	Testemunha	Controle negativo	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. corylophilum</i>
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
1	51,90± 15,42 Aa	52,20± 8,78 Aa	24,70± 15,51 Aa	37,50± 12,09 Aa
2	44,60± 19,43 Aab	58,50±23,43 Aa	43,70± 11,06 Ab	48,70± 16,60 Aab
3	42,90± 9,22 Aa	51,60±19,18 Aa	39,70± 23,97 Aa	37,10±14,56 Aa
4	38,20± 16,10 Aa	49,90± 16,36 Aa	31,80±21,57 Aa	25,30±15,41 Aa
5	34,70± 21,31 Aa	34,20±23,84 Aa	35,00±30,33 Aa	36,40±33,29 Aa
6	41,50± 11,55 Aa	43,50± 21,56 Aa	24,80± 29,67 Aa	12,70±25, Aa
7	25,50± 22,15	27,30± 19,18	22,30±21,84	29,00± 29,78
8	45,10± 7,28	37,10± 13,48	17,20±30,13	22,63±28,14
9	27,40± 13,86	45,30± 19,55	32,30±28,58	25,43±15,00
10	42,30± 23,10	40,10± 18,51	16,75± 22,77	25,86±27,
11	43,50± 28,91	31,50± 26,33	23,83±28,40	14,57±18,46
12	37,89± 26,59	27,80± 23,79	17,50±30,13	29,50±12,03
13	35,44± 21,08	21,00± 22,55	5	27,00±11,31
14	33,67± 20,89	30,00± 21,18	2	-

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna. Letras minúsculas referem-se a análise entre as colunas. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis  $p > 0,05$ ). (-)= ausência de coleta, devido a morte dos espécimes.

### 4.5.3. Granulócitos

Os granulócitos, células fagocitárias, apresentaram grandes variações entre as médias nos diferentes tratamentos. O grupo testemunha apresentou uma amplitude de zero a  $12,80 \pm 8,34$  e  $21,00 \pm 12,98$  a  $0,50 \pm 1,08$  para o grupo inoculado com placebo (controle negativo). No primeiro dia de coleta o grupo controle negativo apresentou uma média superior ao grupo testemunha. Entretanto a partir do segundo dia, estes valores foram decrescendo, enquanto que o grupo testemunha apresentou situação inversa até o dia quatro. Em ambos os grupos foram observadas oscilações na média de células encontradas (Tabela 4). Apesar destas médias apresentarem variações acentuadas nos diferentes dias, estas alterações não foram consideradas estatisticamente significativas, exceto no primeiro dia de coleta do grupo controle negativo em relação ao quinto e sexto dia após inoculação. Foi também constatada diferença entre o grupo controle negativo e o inoculado com *P. corylophilum* no primeiro dia após inoculação. Não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos aplicados aos grupos de carrapatos, demonstrando que mesmo ocorrendo mortalidade, não houve estímulo permanente do sistema de defesa imunológico celular que pudesse provocar alteração na composição celular (Tabela 4). Estas células, juntamente com plasmatócitos, são responsáveis pela fagocitose de corpos estranhos na hemolinfa e dependendo do potencial patogênico estes microorganismos são rapidamente retirados da hemolinfa (CROSSLEY, 1975) este fato pode explicar a grande variabilidade e oscilação na frequência destas células.



**Tabela 4.** Média e desvio padrão de granulócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com *Fusarium oxysporum* e *Penicillium corylophilum*.

Coletas	Testemunha	Controle negativo	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. corylophilum</i>
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
1	4,70± 8,27 Aab	21,00 ±12,98 Aa	8,30 ± 6,98 Aab	3,00 ± 5,37 Ab
2	11,40± 9,54 Aa	10,80± 6, ABa	6,10± 8,17 Aa	2,80 ± 3,39 Aa
3	12,80±8,34 Aa	11,00± 9,39 ABa	3,00±4,40 Aa	6,00± 7,92 Aa
4	12,50±9,68 Aa	8,80± 7,39 ABa	7,10±5,78 Aa	7,40± 5,78 Aa
5	1,00±1,70 Aa	5,50±15,40 Ba	2,90±5,59 Aa	3,50± 3,72 Aa
6	5,10±5,86 Aa	1,50± 2,17 Ba	0,30±0,95) Aa	0,60± 1,26 Aa
7	1,40±3,27	2,90±6,33	1,80±3,16	5,38± 7,29
8	1,80± 2,57	5,00±5,87	1,50±3,17	0,25±0,71
9	0,60±1,07	3,10± 5,67	4,00± 8,91	3,71± 3,59
10	0,80± 1,32	2,20± 3,85	1,88± 2,80	3,86±8,21
11	1,70± 3,83	2,50± 4,06	2,50±3,56	1,43± 1,99
12	1,2± 2,44	0,50± 1,08	1,67± 2,88	0,50± 0,55
13	0,00±0,00	2,00± 2,62	0,00	5,50± 7,78
14	2,22±5,59	2,63± 4,84	5,00	-

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna. Letras minúsculas referem-se a análise entre as colunas. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis  $p > 0,05$ ). (-)= ausência de coleta, devido a morte dos espécimes.

#### 4.5.4. Esferulócitos

Os esferulócitos apresentaram uma dinâmica semelhante aos tipos celulares anteriormente citados, no que se refere às oscilações das médias em diferentes dias de coleta. (Tabela 5).

O grupo tratado com *P. corylophilum* apresentou médias superiores em relação a testemunha e o controle negativo nos quatro primeiros dias após inoculação e, quando comparado com o grupo inoculado com *F. oxysporum*, as médias foram superiores apenas nos dois primeiros dias, apesar desta diferença não ser significativa ( $p < 0,05$ ). Este fato foi observado somente neste tipo celular, o que sugere um maior estímulo à resposta celular. (Tabela 5).

A resposta imune envolve agregações celulares nos quais estão envolvidos os esferulócitos, segundo Crossley (1975), isto pode justificar o maior número destas células encontradas nos grupos tratados com ambos os fungos, em relação a testemunha e controle negativo, nos primeiros dias após inoculação, por estarem desempenhando tal função, sugerindo a “segunda etapa de fagocitose”. Silva et al. (2000), ao inocular *C. albicans* em insetos, constatou que o período de atividade fagocitária dos plasmatócitos e granulócitos ocorreu de 6 a 18 horas, após inoculação, diminuindo em número no intervalo de 18 a 24 horas. No entanto, no presente estudo, a primeira observação foi realizada 24 horas após inoculação, quando se observou um número pequeno destes tipos celulares em relação ao grupo testemunha e controle negativo, devido a mobilização destas células para formação de agregados ou nódulos. Como os artrópodes apresentam semelhança em relação ao mecanismo de resposta celular, acredita-se desta forma que o primeiro momento de fagocitose seja realizado por plasmatócitos e granulócitos no intervalo anteriormente citado e a segunda seja realizada pelos esferulócitos em uma etapa subsequente.

Os esferulócitos observados nos grupos testemunha e tratados com *P. corylophilum* apresentaram diferenças significativas no sexto dia, após a inoculação, enquanto para o grupo inoculado com *F. oxysporum* diferiram entre o quarto e quinto dia após inoculação (Tabela 5).

Foi observado um pequeno declínio no número de células no grupo do controle negativo nos últimos dias de coletas, contudo considerado normal devido ao fato de ser a fase final do ciclo de vida do carrapato. Estas células estão envolvidas na formação de cápsulas e nódulos, sendo que durante este processo são retiradas hemolinfa e depositadas nos tecidos. Não há relatos de uma atividade específica destas células em carrapatos, somente em relação ao seu percentual, por ser uma das mais numerosas no seu organismo (DOLP, 1970). Pela observação de um grande número de grânulos escuros na hemolinfa pode-se sugerir que ocorreu uma resposta celular através do processo de degranulação. Contudo não foi possível estabelecer como este tipo celular se comporta perante a inoculação de diferentes agentes infecciosos. Estas células não têm sido encontradas em algumas espécies de artrópodes e devido à divergência na literatura em alguns trabalhos são classificadas como células granulares, fazendo referência ao número e tamanhos dos grânulos em citoplasma (BRINTON; BURGDOFER, 1971).

**Tabela 5.** Média e desvio padrão de esferulócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha e controle negativo, inoculados com *Fusarium oxysporum* e *Penicillium corylophilum*.

Coletas	Testemunha	Controle negativo	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. corylophilum</i>
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
1	25,90±11,17 Aa	16,00±8,83 Aa	39,60± 16,44 Aa	45,10± 12,78 Aa
2	18,90± 16,68 Aa	15,60±10,72 Aa	37,60± 13,74 Aa	31,60± 16,30 Aa
3	23,20±13,25 Aa	10,70± 4,32 Aa	16,90±13,04 ABa	38,50± 19,43 Aa
4	19,20 ± 7,30 Aa	18,00± 11,26 Aa	6,50±10,87 Ba	22,50± 20,01 Aa
5	27,70 ± 18,03 Aa	18,70± 17,17 Aa	15,60± 13,54 Aa	7,80± 12,40 Aa
6	32,30±10,97 Aa	29,30± 10,57 Aa	10,50± 8,86 Aa	6,10± 11,96 Ab
7	28,60±17,56	19,20± 20,93	14,60± 12,12	5,38± 6,14
8	31,60±14,42	28,20± ±13,39	12,90± 12,13	7,50± 12,31
9	30,90± 16,04	24,90±17,43	12,10 ±10,59	9,14± 11,98
10	25,40± 24,05	24,80± 13,68	16,25±29,25	2,14± 3,76
11	29,10±23,01	22,10± 14,33	14,67±20,08	2,71±4,50
12	22,00± 11,45	21,60± 12,49	11,50±16,42	4,50±3,39
13	19,78±19,43	20,30±15,68	10,00	3,50± 2,12
14	23,11±18,	9,38± 11,62	10,00	-

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna. Letras minúsculas referem-se a análise entre as colunas. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis  $p > 0,05$ . (-) = ausência de coleta, devido a morte dos espécimes.

#### 4.5.5. Oenocitóides

Oenocitóides foram encontrados em pequenas quantidades, embora estivessem presentes em todos os grupos pesquisados. Não foram observadas médias superiores a  $1,3 \pm 1,83$  para o grupo testemunha, sendo este valor encontrado unicamente no terceiro dia de coleta, já no grupo inoculado com placebo foi observado um valor médio máximo no quarto e nono dia após inoculação apresentando  $0,40 \pm 0,84$  e  $0,40 \pm 1,26$  respectivamente (Tabela 6).

Nos grupos inoculados com fungos não entomopatogênicos, apesar de apresentarem uma média superior à observada no grupo inoculado com placebo (controle negativo), não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Numericamente este tipo celular não demonstrou ter atuação mais efetiva sobre a resposta celular neste caso. Contudo, sua atividade está relacionada à ativação da cascata de profenoloxidase, um mecanismo de resposta humoral que é acionado no momento em que um corpo estranho é detectado na hemolinfa e não ao processo de fagocitose, sendo talvez o motivo de se apresentarem em pequenas quantidades (Tabela 6).

**Tabela 6.** Média e desvio padrão de oenocitóides identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha, controle negativo, inoculados com *Fusarium oxysporum* e *Penicillium corylophilum*.

Coletas	Testemunha	Controle negativo	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. corylophilum</i>
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
1	0,60 ± 1,26 Aa	0,20± 0,63 Aa	0,40± 0,84 Aa	0,40± 0,84 Aa
2	0,50± 1,08 Aa	0,00± 0,00 Aa	0,00± 0,00 Aa	0,00± 0,00 Aa
3	1,30±1,83 Aa	0,00±0,00 Aa	0,10± 0,32 Aa	0,00± 0,00 Aa
4	0,40± 0,84 Aa	0,40±0,84 Aa	0,50± 1,08 Aa	0,40± 0,84 Aa
5	0,00±0,00 Aa	0,20±0,63 Aa	0,63± 0,30 (20) Aa	0,00± 0,00 Aa
6	0,00± 0,00 Aa	0,00±0,00 Aa	0,00± 0,00 (20) Aa	0,50± 1,08 Aa
7	0,00±0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00
8	0,00±0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00
9	0,20±0,63	0,40± 1,26	0,00± 0,00	0,14± 0,38
10	0,10± 0,32	0,00±0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00
11	0,00± 00,00	0,20±0,63	0,00± 00,00	0,00± 00,00
12	0,00± 0,00	0,20± 0,63	0,00± 0,00	0,00± 0,00
13	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00	0,00± 0,00
14	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00	-

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna. Letras minúsculas referem-se a análise entre as colunas. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis  $p > 0,05$ ). (-)= ausência de coleta, devido a morte dos espécimes.

#### 4.5.6. Células não identificadas

As células indeterminadas são, geralmente, encontradas na hemolinfa, cuja população durante o período de ingurgitamento, sofre uma intensa atividade de divisão celular (TSILENEVA, 1959). A média de células com alterações morfológicas apresentaram intervalos de  $10,10 \pm 6,15$  a  $0,70 \pm 2,21$  para o grupo controle e de zero a  $7,40 \pm 14,39$  para o grupo inoculado com placebo. Enquanto que nos grupos tratados com fungos os intervalos ficaram entre  $1,00 \pm 2,83$  a  $9,80 \pm 6,07$  e zero a  $12,43 \pm 14,63$  para *F. oxysporum* e *P. corylophilum*, respectivamente (Tabela 7).

As médias estudadas não apresentaram diferenças significativas entre os seis primeiros dias analisados, evidenciando que não houve alteração na estrutura da população destas células no período analisado. Entretanto, foi mantido o padrão observado para os outros tipos celulares que apresentaram variações em seu número durante o período estudado, demonstrado através dos picos celulares observados.

Células com características indeterminadas ou alterações morfológicas, devido ao fato de estarem fortemente coradas ou durante o processo de mitose foram encontradas em todos os grupos estudados. Em *R. sanguineus*, Carneiro (1995) classificando estas células como indeterminadas relata seu aparecimento em fêmeas ingurgitadas, mas em pequena quantidade.

**Tabela 7.** Média e desvio padrão de células não identificadas na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha, controle negativo e inoculados com *Fusarium oxysporum* e *Penicillium corylophilum*.

Coletas	Testemunha	Controle negativo	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. corylophilum</i>
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
1	8,10± 5,84 Aa	2,20± 3, Aa	5,60± 5,42 Aa	3,90± 5,45 Aa
2	4,90± 4,51 Aa	0,00± 0,00 Aa	4,80± 6,61 Aa	10,70± 10,17 Aa
3	6,40± 3,92 Aa	7,30± 7,89 Aa	6,80± 8,02 Aa	5,90± 5,69 Aa
4	10,10± 6,15 Aa	6,30± 5,14 Aa	9,80± 6,07 Aa	10,60± 10,33 Aa
5	0,90± 2,85 Aa	7,40± 14,39 Aa	1,90± 3,60 Aa	5,70± 7,35 Aa
6	2,10 ± 3,18 Aa	0,00± 0,00 Aa	1,00± 2,83 Aa	3,80± 7,67 Aa
7	1,50± 4,74	0,90± 2,85	4,40± 6,33	1,50±4,24
8	2,00± 3,30	2,30± 3,77	1,30± 4,11	3,13± 8,84
9	5,0± 8,72	0,90± 2,02	8,60± 11,29	8,00± 10,89
10	0,70± 2,21	4,30± 5,08	4,00±5,21	12,43± 14,63
11	4,10± 5,49	2,10± 3,60	4,00± 6,32	8,29± 11,69
12	2,22± 3,42	3,60± 5,46	3,17± 4,92	4,83± 8,01
13	3,78± 3,03	6,20± 10,27	20,00	0,00± 0,00
14	3,56± 3,71	4,50± 5,01	12,00	-

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna. Letras minúsculas referem-se a análise entre as colunas. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis  $p > 0,05$ ). (-)= ausência de coleta, devido a morte dos espécimes.

## 4.6 Resposta Celular em Carrapatos Inoculados com Fungos Entomopatogênicos (*Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*)

### 4.6.1. Pró-hemócitos

Dentre os valores médios de pró-hemócitos identificados nos grupos inoculados com fungos entomopatogênicos, somente *B. bassiana* apresentou diferença significativa em relação ao controle e placebo, no terceiro dia após inoculação, período em que não foi mais observada a presença deste tipo celular na hemolinfa. Foi também constatada diferença significativa entre os dias analisados (1 e 3 dia) para *B. bassiana*, evidenciando a diminuição acentuada destas células, chegando a zerar no terceiro dia de coleta (Tabela 8).

A ausência de células na hemolinfa observada após período de 48 horas indicam imunossupressão do sistema de defesa que pode estar associado à produção e secreção de enzimas pelo fungo *B. bassiana* alterando componentes celulares da hemolinfa (HUNG, 1993). O grupo inoculado com *M. anisopliae* também apresentou diminuição acentuada a partir do quarto dia de coleta, sendo que nos dias anteriores apresentaram um aumento em relação ao segundo dia que apresentou uma média de  $0,30 \pm 0,67$  (Tabela 8).

Nos grupos tratados com *M. anisopliae* o maior valor médio do número de células foi observado no quarto dia após inoculação e após este período o número de células foi decrescendo progressivamente. Outro fator que pode interferir é o tipo de inóculo, pois dependendo daquele que for utilizado o organismo pode responder de forma diferenciada, fato observado por Inoue et al. (2001), que também não registraram alteração significativa da estrutura da população de células após inoculação de gotículas de poliestireno fluorescente em *O. moubata*. O mesmo padrão foi observado na população de células em *Manduca sexta* inoculadas com microesferas de látex. A inoculação de bactérias provocou a depressão de plasmatócitos (GENG; DUNN, 1989). No caso dos fungos também não houve uma variação acentuada dos tipos celulares em relação aos valores normais de hemócitos, exceto para os inoculados com *B. bassiana* que apresentou uma redução significativa de pró-hemócitos; a inibição deste tipo celular ocorreu de forma significativa.

A amplitude de variação dos valores médios do número de células para *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi zero a  $8,00 \pm 4,90$  e de zero a  $16,30 \pm 13,77$  respectivamente, enquanto que para os grupos testemunha e controle negativo foram de zero a  $10,00 \pm 4,48$  e  $0,40 \pm 8,40$  (Tabela 8). O alto número de pró-hemócitos no grupo inoculado com *B. bassiana* em relação aos outros grupos no início pode indicar que houve uma tentativa do organismo em responder ao processo infeccioso, através da mobilização celular. Posteriormente, foi observada a ausência de células na hemolinfa em função da atuação inibidora da resposta celular pelo fungo *B. bassiana*. Normalmente estas células são encontradas em pequenas quantidades, apesar de ser responsável pela origem dos outros tipos celulares através de sua diferenciação em outras células, situação observada na maioria dos insetos (ARNOLD, 1974).

Em relação ao período de vida destes espécimes, os carrapatos inoculados com *M. anisopliae* sobreviveram por um tempo superior aos inoculados com *B. bassiana* (Tabela 8).



**Tabela 8.** Média e desvio padrão de pró-hemócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha, controle negativo, inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Coletas	Testemunha	Controle negativo	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
1	3,60 ± 3,20 Aa	8,40± 4,58 Aa	6,30± 7,75 A	16,30± 13,77 Aa
2	5,80± 6,37 Aa	4,20± 3,68 Aa	0,30 ± 0,67 Aa	6,60± 4,88 Aa
3	9,10± 6,42 Aa	8,20± 5,67 Aa	4,80 ± 6,73 Aa	0,0± 0,00 Bb
4	10,00± 4,48	8,90± 6,24	8,00± 4,90	0, ± 0,00
5	1,30± 1,83	1,00±1,49	4,00± 6,31	-
6	1,30± 1,49	1,80± 1,40	2,80± 3,52	-
7	0,00± 0,00	0,80± 1,40	0,86± 2,27	-
8	0,40± 0,97	0,60± 0,97	0,25± 0,50	-
9	0,60± 1,35	0,90± 1,20	0,00± 0,00	-
10	1,90± 4,07	0,90± 1,29	00	-
11	0,60± 0,84	1,40± 1,84	-	-
12	0,67 ± 1,41	1,10± 1,73	-	-
13	3,44± 7,81	0,40± 0,84	-	-
14	0,44± 1,33	1,25±1,75	-	-

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna. Letras minúsculas referem-se a análise entre as colunas. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis  $p > 0,05$ . (-)= ausência de coleta, devido a morte dos espécimes.

#### 4.6.2. Plasmatócitos

Os plasmatócitos apresentaram oscilações nos valores médios durante os diferentes dias de coletas. As médias calculadas apresentaram uma amplitude de variação de  $27,33 \pm 4,00$  a  $69,80 \pm 27,28$  para *M. anisopliae* e zero a  $35,40 \pm 19,83$  para *B. bassiana*, com exceção do segundo e sétimo dias de coleta, o grupo inoculado com *M. anisopliae* apresentou uma diminuição progressiva deste tipo celular. Esta diminuição nos tipos celulares também foi observada para o grupo inoculado com *B. bassiana*, seguido pela completa ausência de células a partir do terceiro dia.

Embora o grupo tratado com *M. anisopliae* tenha apresentado uma diminuição na média das células, não foi possível inferir que o sistema imune do carrapato tenha sofrido algum tipo de inibição como observado no grupo inoculado com *B. bassiana*. A partir da terceira coleta de hemolinfa foi observada mortalidade acentuada neste grupo, representando praticamente 40% do grupo, sendo que no quarto dia já não foi mais possível coleta hemolinfa por ausência de espécimes vivos.

**Tabela 9.** Média e desvio padrão de plasmatócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha, controle negativo, inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Coletas	Testemunha	Controle negativo	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
1	51,90± 15,42Aa	52,20± 8,78 Aa	57,5±9,12 Aa	35,40± 19,83 Aa
2	44,60± 19,43 Aa	58,50±23,43 Aa	69,80± 27,28 Abc	11,30±7,93Bb
3	42,90± 9,22Aa	51,60±19,18 Aa	48,50± 12,31 Aa	0,00±0,00Ab
4	38,20± 16,10	49,90± 16,36	37,50± 7,85	0,00±0,00
5	34,70± 21,31	34,20±23,84	32,80± 25,91	-
6	41,50± 11,55	43,50± 21,56	28,30±13,40	-
7	25,50± 22,15	27,30± 19,18	30,14±5,18	-
8	45,10± 7,28	37,10± 13,48	27,50±18,57	-
9	27,40± 13,86	45,30± 19,55	27,33± 4,00	-
10	42,30± 23,10	40,10± 18,51	22,00	-
11	43,50± 28,	31,50± 26,33	-	-
12	37,89± 26,59	27,80± 23,79	-	-
13	35,44± 21,08	21,00± 22,55	-	-
14	33,67± 20,89	30,00± 21,18	-	-

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna. Letras minúsculas referem-se a análise entre as colunas. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis  $p > 0,05$ ). (-) = ausência de coleta, devido a morte dos espécimes.

### 4.6.3. Granulócitos

Os granulócitos, da mesma forma que os outros tipos celulares, também apresentaram variações nos diferentes dias de coletas. Nos carrapatos inoculados com *M. anisopliae* as células apresentaram um aumento acentuado no terceiro dia após inoculação, enquanto que no grupo tratado com *B. bassiana* houve um aumento no segundo dia após inoculação, seguido por uma diminuição acentuada destes valores até a ausência destas células nas amostras posteriores (Tabela 10).

Em relação a dinâmica, a diminuição na média destas células foi descrita por Silva et al. (2000) ao observar a resposta celular em mosquitos (*Culex quinquefasciatus*) quando inoculados com *C. albicans*, sendo constatada a diminuição de granulócitos ao contrário da população de plasmatócitos que aumentou. Foi observada a fagocitose dos conídios inoculados e formação de nódulos na parede dos tecidos após um período de 72 horas. Entretanto no presente estudo esta avaliação não foi realizada para a comprovação do seqüestro destas células da circulação como citado anteriormente.

Segundo Gillespie et al., (1997) os granulócitos, juntamente com plasmatócitos são as principais células de defesa para os carrapatos. O fungo *B. bassiana* durante seu desenvolvimento produz compostos que além de inibir a produção de pseudopodes, afeta a dispersão destas células, característica muito importante para o reconhecimento de corpos estranhos no organismo do hospedeiro.

Segundo Huxham et al. (1989b) dependendo da cepa utilizada, a quantidade de células utilizadas no inóculo também pode acarretar diferentes efeitos sobre a população de hemócitos.

O padrão de defesa imunológica exercido por estas células não apresenta uma regularidade, pois o número de células livres na hemolinfa é extremamente variável, apresentando oscilações em diferentes dias após inoculação. Johns et al. (1998) ao pesquisar o mecanismo de defesa de *D. variabilis* inoculados com diferentes bactérias observaram que o número de hemócitos aumentou em aproximadamente seis vezes em relação ao grupo testemunha, entretanto este aumento não se manteve, pois com 72 horas a contagem de hemócitos não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Característica não observada no presente trabalho. Entretanto, quaisquer alterações na população de hemócitos são importantes para o controle de infecção pelo organismo (JOHNS et al. 1998).

**Tabela 10.** Média e desvio padrão de granulócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha, controle negativo, inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Coletas	Testemunha	Controle negativo	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
1	4,70± 8,27Aa	21,00 ±12,98 Ab	8,40± 9,30 Aab	12,20± 11,97 Aab
2	11,40± 9,54 Aa	10,80± 6,60 Aa	4,70± 4,52 Aa	16,80± 18,44 Aa
3	12,80±8,34 Aa	11,00± 9,39 Aa	17,80± 14,83 Aab	0,00± 0,00 Bac
4	12,50±9,68	8,80± 7,39	17,30± 11,47	0,00± 0,00
5	1,00±1,70	5,50±15,40	5,50± 15,40	-
6	5,10±5,86	1,50± 2,17	6,30± 11,47	-
7	1,40±3,27	2,90±6,33	9,86± 6,99	-
8	1,80± 2,57	5,00±5,87	3,50± 3,11	-
9	0,60±1,07	3,10± 5,67	4,00± 3,61	-
10	0,80± 1,32	2,20± 3,85	3,00	-
11	1,70± 3,83	2,50± 4,06	-	-
12	1,2± 2,44	0,50± 1,08	-	-
13	0,00±0,00	2,00± 2,62	-	-
14	2,22±5,59	2,63± 4,84	-	-

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna. Letras minúsculas referem-se a análise entre as colunas. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis  $p > 0,05$ ). (-)= ausência de coleta, devido a morte dos espécimes.

#### 4.6.4. Esferulócitos

Estas células apresentaram uma dinâmica muito variável, com aumento e diminuição do número de células em períodos intercalados das coletas de hemolinfa (Tabela 11).

O grupo tratado com *M. anisopliae* apresentou médias superiores em relação ao controle negativo somente no primeiro dia após inoculação, e quando comparado com o grupo inoculado com *B. bassiana*, as médias foram superiores em todos os dias estudados, sendo observada diferença significativa no primeiro e terceiro dias após inoculação (Tabela 11).

O número de esferulócitos observado no grupo tratado com *M. anisopliae* não apresentou diferença significativa em relação ao grupo testemunha, apresentando valores inferiores em todos os dias analisados. Esta média sugere que ao invés do organismo responder a infecção através da divisão e diferenciação celular, o fungo germinou e se desenvolveu no seu organismo não sendo reconhecido como um corpo estranho, e provocando talvez uma leve inibição desta resposta, pois o número de células permaneceu sempre inferior ao grupo testemunha, como também em relação ao controle negativo, excetos pelo primeiro, segundo e terceiro dia.

A inibição ou não reconhecimento do fungo como algo estranho ao organismo foi referenciado por Huxham et al. (1998a) quando cita o efeito inibitório de destruxinas produzidos por *M. anisopliae* sobre a resposta celular em insetos. Esta substância está associada à redução na formação dos agregados celulares provocando uma acentuada redução na formação de nódulos e não ativação da cascata de profenoloxidase. Entretanto, o autor não comenta sobre a atuação deste fungo sobre a população de células.

No tratamento com *B. bassiana* foi observada uma diminuição progressiva no número de células, sendo que no último dia de coleta não foram observadas células na hemolinfa, evidenciando uma atuação de imunossupressão deste fungo sobre este tipo celular. Diferentemente de *M. anisopliae*, que tem sua atividade imunossupressora associada a produção de destruxinas A e B, *B. bassiana* não foi esclarecido qual a toxina envolvida neste processo. Hung et al. (1993) ao comparar a atuação de *C. albicans* e *B. bassiana* em *S. exigua* relata que apesar deste fungo ter sido rapidamente fagocitado por granulócitos após inoculação, ele não foi destruído, sendo observado posteriormente o crescimento de hifas na circulação e uma diminuição no número de células circulantes, sugerindo que este fungo é resistente ao processo de fagocitose. Foi também observado que *B. bassiana* provocou uma diminuição marcante no número de células circulantes.

**Tabela 11.** Média e desvio padrão de esferulócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha, controle negativo, inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Coleta	Testemunha	Controle negativo	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
1	25,90±11,17 Aa	16,00±8,83 Aac	19,30± 12,33 Aac	9,00± 5,93Aa
2	18,90± 16,68 Aa	15,60±10, Aa	12,20± 12,56 Aa	4,80± 8,12Aa
3	23,20±13,25 Aa	10,70± 4,32 Aac	13,50±13,82 Aac	0,30± 0,95 Abc
4	19,20 ± 7,30	18,00± 11,26	18,50±8,91	0,00± 0,00
5	27,70 ± 18,03	18,70± 17,17	8,20± 8,74	-
6	32,30±10,97	29,30± 10,57	5,00± 7,19	-
7	28,60±17,56	19,20± 20,93	4,14± 7,06	-
8	31,60±14,42	28,20± ±13,39	4,00± 8,	-
9	30,90± 16,04	24,90±17,43	5,53± 4,16	-
10	25,40± 24,05	24,80± 13,68	0,00	-
11	29,10±23,01	22,10± 14,33	-	-
12	22,00± 11,45	21,60± 12,49	-	-
13	19,78±19,43	20,30±15,68	-	-
14	23,11±18,22	9,38± 11,62	-	-

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna. Letras minúsculas referem-se a análise entre as colunas. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis  $p > 0,05$ ). (-)= ausência de coleta, devido a morte dos espécimes.

#### 4.6.5. Oenocitóides

Estas células foram encontradas em pequenas quantidades em todos os grupos estudados. Nos grupos inoculados com fungos, apesar de apresentarem uma média superior à observada no grupo inoculado com placebo (controle negativo), não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Numericamente este tipo celular parece não apresentar importância mais efetiva sobre a resposta celular. Contudo, devido ao fato de ser uma célula com atividade relacionada à ativação da cascata de proenoloxidase e não ao processo de fagocitose, mecanismo que exige um número maior de células circulantes, há a necessidade de uma avaliação posterior direcionada para estes aspectos. Mesmo em carrapatos que não sofreram desafios com corpos estranhos, este tipo celular é considerado pouco comum, conforme relatado por Brinton e Burgdorfer (1971) em *D. andersoni stalis* (Tabela 12).

Embora o presente experimento tenha avaliado o efeito de fungos sobre este tipo celular, obteve-se resultado semelhante ao de Carneiro (1995) em relação a pequena quantidade de células observadas em fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*, quando somente após sete dias do início da postura, estas células puderam ser encontradas.

Tanto nas amostras inoculadas com *M. anisopliae* como *B. bassiana* as médias máximas atingidas por estas células não ultrapassaram  $0,60 \pm 0,97$  e  $0,60 \pm 1,26$ , respectivamente. No grupo inoculado com *B. bassiana* foi reforçada a característica imunossupressora deste fungo sobre a população de células circulantes como observado para os outros tipos celulares.



**Tabela 12.** Média e desvio padrão de oenocitóides identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos testemunha, controle negativo, inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Coletas	Testemunha	Controle negativo	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
1	0,60 ± 1,26Aa	0,20± 0,63 Aa	0,20± 0,63 Aa	0,60± 1,26 Aa
2	0,50± 1,08 Aa	0,00± 0,00 Aa	0,30± 0,67 Aa	0,30± 0,95 Aa
3	1,30±1,83 Aa	0,00±0,00 Aa	0,00± 0,00 Aa	0,00± 0,00 Aa
4	0,40± 0,84	0,40±0,84	0,60± 0,97	0,00± 0,00
5	0,00±0,00	0,20±0,63	0,00± 0,00	-
6	0,00± 0,00	0,00±0,00	0,50± 1,58	-
7	0,00±0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00	-
8	0,00±0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00	-
9	0,20±0,63	0,40± 1,26	0,00± 0,00	-
10	0,10± 0,32	0,00±0,00	0,00	-
11	0,00± 00,00	0,20±0,63	-	-
12	0,00± 0,00	0,20± 0,63	-	-
13	0,00± 0,00	0,00± 0,00	-	-
14	0,00± 0,00	0,00± 0,00	-	-

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna. Letras minúsculas referem-se a análise entre as colunas. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis  $p > 0,05$ ). (-)= ausência de coleta, devido a morte dos espécimes.

#### 4.6.6. Células não identificadas

Durante o estudo foram encontradas várias células apresentando características indeterminadas que impossibilitaram sua identificação. As médias de células observadas para *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram superiores as do grupo testemunha e controle negativo no primeiro dia após inoculação.

No grupo inoculado com *B. bassiana* foi observada diferença significativa em relação ao grupo testemunha no segundo dia de coleta, como também entre os dias dentro deste mesmo tratamento (Tabela 13), enquanto o número de hemócitos diminuía nas coletas posteriores, o número de células não identificadas aumentou, levando a crer que estas células tenham tido sua membrana citoplasmática alterada pela presença do fungo na hemolinfa, situação também observada por Hung et al. (1993) em *S. exigua*. Outra característica que evidencia o potencial patogênico dos fungos, mesmo não tendo causado uma modificação definitiva na população celular, é a mortalidade dos espécimes nos diferentes tratamentos.

O grupo inoculado com *B. bassiana* começou a apresentar mortalidade das amostras a partir do terceiro dia de coleta, com perda total do grupo formado no quinto dia após inoculação, enquanto que nos espécimes inoculados com *M. anisopliae* foi observada a mortalidade a partir do sétimo dia, se estendendo até o décimo primeiro dia após inoculação. O resultado é semelhante ao apresentado por Bittencourt et al., (1995) ao avaliar fêmeas de *B. microplus* tratados com *M. anisopliae* que apresentaram uma mortalidade a partir do sétimo dia após inoculação, quando apresentaram o desenvolvimento deste fungo em praticamente todos os órgãos estudados através do cortes histológicos, entretanto havia sido encontrado na hemolinfa a partir do segundo dia.

Uma característica importante a ser considerada é a metodologia adotada no tratamento com os fungos e que pode influenciar na longevidade dos espécimes. Neste trabalho, o contato dos carrapatos com o fungo foi através de inoculação direta de conídios no interior da cavidade celomática, enquanto que nas citações de literaturas eram adotadas as imersões do espécime em suspensão fúngica por um período aproximado de três minutos.

**Tabela 13.** Média e desvio padrão de células não identificadas na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos Testemunha, controle negativo, inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Coletas	Testemunha	Controle negativo	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
1	8,10± 5,84 Aa	2,20± 3,61 Aa	8,30± 8,72 Aa	4,90± 8,29 ABa
2	4,90± 4,51 Aa	0,00± 0,00 Aab	6,50± 7,66 Aab	22,40± 17,17 Ab
3	6,40± 3,92Aa	7,30± 7,89 Aa	10,70± 9,23 Aa	1,00± 2,54 Ba
4	10,10± 6,15	6,30± 5,14	16,80± 7,79	0,50± 1,08
5	0,90± 2,85	7,40± 14,39	7,40± 14,39	-
6	2,10 ± 3,18	0,00± 0,00	12,40± 9,56	-
7	1,50± 4,74	0,90± 2,85	6,00± 8,74	-
8	2,00± 3,30	2,30± 3,77	21,00± 14,58	-
9	5,0± 8,72	0,90± 2,02	0,00± 0,00	-
10	0,70± 2,21	4,30± 5,	31,00	-
11	4,10± 5,49	2,10± 3,60	-	-
12	2,22± 3,42	3,60± 5,46	-	-
13	3,78± 3,03	6,20± 10,27	-	-
14	3,56± 3,71	4,50± 5,	-	-

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna. Letras minúsculas referem-se a análise entre as colunas. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis  $p > 0,05$ ). (-)= ausência de coleta, devido a morte dos espécimes.

#### 4.7 Mortalidade de *B. microplus* e avaliação dos tipos celulares mais prevalentes identificados na hemolinfa

O grupo inoculado com *B. bassiana* começou a apresentar mortalidade das amostras a partir do terceiro dia de coleta, com perda total do grupo formado no quinto dia após inoculação, enquanto que nos espécimes inoculados com *M. anisopliae* foram observados a mortalidade a partir do sétimo dia, se estendendo até décimo primeiro dia após inoculação. O resultado é semelhante ao verificado por Bittencourt et al., (1995) ao avaliar fêmeas de *B. microplus* tratados com *M. anisopliae* que apresentaram uma mortalidade a partir do sétimo dia após inoculação, quando demonstraram o desenvolvimento deste fungo em praticamente todos os órgãos estudados através de cortes histológicos, entretanto havia sido encontrado na hemolinfa a partir do segundo dia.

Diferentemente do trabalho de Frazzon et al., (2000) que observou 100% de mortalidade em fêmeas de *B. microplus* no período de duas semanas após exposição aos conídios de *M. anisopliae* (isolado E6S1). Relaciona ainda a produção de quitinases e proteases como a chave para o processo de penetração no hospedeiro.

Uma característica importante a ser considerada é a metodologia adotada no tratamento com os fungos e que pode influenciar na longevidade dos espécimes. Neste trabalho, o contato dos carrapatos com o fungo foi através de inoculação direta de conídios na cavidade celomática, enquanto que nas citações anteriores foram adotadas as imersões dos espécimes em suspensão fúngica por um período aproximado de três minutos.

A longevidade dos carrapatos tratados com *P. corylophilum* foi menor quando comparada aos grupos inoculados com placebo e com *F. oxysporum*, apesar de não haver diferença significativa entre os tipos celulares destes grupos. Ao comparar a atuação destes dois fungos observou-se que *F. oxysporum* apresentou maior agressividade do que o *P. corylophilum*, devido a mortalidade antecipada dos carrapatos pertencentes a este grupo, estes valores estão representados no anexo I (Quadro 1).

No grupo tratado com *F. oxysporum* a mortalidade foi observada a partir do décimo dia após inoculação, estendendo-se até ao décimo quarto dia após a inoculação, enquanto que no grupo tratado com *P. corylophilum* teve início no sétimo dia. Os grupos testemunha e controle negativo iniciaram no décimo segundo dia e décimo quarto após a inoculação, respectivamente. Este resultado demonstra que apesar destes fungos serem não entomopatogênicos diminuíram a longevidade dos carrapatos, com destaque para o *P. corylophilum*, levando a crer que estes fungos possuem um possível potencial patogênico sobre *B. microplus*, entretanto há necessidade de estudos imunológicos, bioquímicos entre outros, para que vários processos sejam esclarecidos.

Quanto aos hemócitos, os plasmatócitos e esferulócitos parecem ser os tipos celulares mais importantes. Através da correlação linear simples e teste exato de Fisher ficou constatado que todas as correlações foram diferentes de zero para os tratamentos com fungos, para os dois tipos celulares, com exceção dos esferulócitos dos grupos testemunha e controle negativo como demonstram os valores apresentados no anexo II (Quadro 1 e 2). Entretanto, se compararmos os plasmatócitos e esferulócitos desses dois grupos veremos que se comportam de maneira parecida, ou seja, a infecção muda a dinâmica celular dos carrapatos adultos, embora não seja possível determinar o que realmente altera a fisiologia dos carrapatos

#### **4.8 Considerações Gerais Sobre a Resposta Celular de *Boophilus microplus* sob Condição de Desafio**

Durante o estudo ficou demonstrado o efeito tóxico/ imunossupressor da infecção causada por *B. bassiana*, demonstrado pelo baixo percentual relativo de plasmatócitos e esferulócitos um dia após a inoculação, a rápida eliminação de todas as células e a mortalidade de todos os carrapatos poucos dias após a inoculação. Foi constatado que *B. bassiana* causou maior mortalidade em menor período de tempo, seguida de *M. anisopliae*; *F. oxysporum* e *P. corylophilum*, embora provoquem mortalidade menos rápida diferindo dos dois primeiros como está representado no anexo I (Quadro 1 ), mas também foi observada no grupo testemunha e controle negativo, como esperado. Observa-se que a simples inoculação de veículo não promove mortalidade significativa de carrapatos em relação ao grupo não inoculado.

A infecção por *M. anisopliae* também provocou uma importante mortalidade com diminuição de células, mesmo antes de todos os carrapatos terem morrido.

Os fungos *F. oxysporum* e *P. corylophilum* comportaram-se de modo semelhante, apresentando efeito menos evidente sobre a estrutura da população de células de forma geral, mas sua presença comprometeu a viabilidade dos carrapatos em relação aos grupos controle negativo e testemunha. Não houve diferenças entre estes grupos quanto a viabilidade dos carrapatos.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados pode-se concluir que:

A composição dos tipos celulares não apresentou variações em *B. microplus* quando inoculados com fungos entomopatogênicos e não entomopatogênicos sob as condições metodológicas adotadas.

O fungo *M. anisopliae* mesmo não exercendo uma atividade inibitória acentuada sobre a resposta celular de *B. microplus* em relação ao número de células circulantes, foi capaz de se instalar e se desenvolver no organismo do carrapato.

O fungo *B. bassiana* exerceu uma forte atividade inibitória sobre a resposta celular de *B. microplus* em relação ao número de células circulantes.

Os fungos não entomopatogênicos não afetaram de forma significativa o sistema imune do carrapato *Boophilus microplus*, sendo rapidamente eliminados do organismo.

Os tipos celulares plasmatócitos e esferulócitos foram as células mais afetadas pela presença dos fungos testados.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, R. U.; GONZALEZ, J. C. A postura e viabilidades de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina, Ixodinae) em condições de laboratório. **Revista Latina América de Microbiologia**, v. 21, p. 31-36, 1979.
- ALVES, S.B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. *In*: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed., FEALQ, Piracicaba, p. 21- 37, 1998.
- ALVES, S.B.; MORAES. Quantificação de inóculo de patógenos de inseto.. *In*: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed., FEALQ, Piracicaba, p. 765-777, 1998.
- ARAGÃO, H.B.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p.115-130, 1961.
- ARNOLD, J.W. The hemocytes of insects. *In*: Rockstein, M (ed.). *The Physiology of Insecta*. New York, **Academic press**, v. 5, p. 201-254, 1974.
- ATHAYDE, A. C. R.; FERRREIRA, U. L.; LIMA, E. A. L. A. Fungos entomopatogênicos. **Biociência**, ano 4, n. 21, p. 12- 15, 2001.
- AYAAD, T. H.; RASHDAN, N. A.; ADHAM, F. K.; GABRE, R. M.; EL-KAMMAH, K. M. The immune defense system of the cattle tick *Boophilus annulatus* (Say) (Acari: Ixodidae): I. Microscopical and ultra structural characterization of hemocytes. **International Journal of Acarology**, v. 26, n. 1, p. 3-9, 2000.
- AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A. Aspects of classification of hemiptera hemocytes from six triatomine species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 1-10, 1991.
- BALASHOV, Y.S. **Bloodsucking ticks (Ixodoidea) - Vectors of diseases in man and animals**. Transl. 500 (T500). Med. Zool. Dep.USNAMRU, Cairo, Egypty, U.A.R. Entomological Society of America, v. 8, n. 5, p. 376, 1972.
- BARBOSA, J. V.; DAEMON, E.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; FACCINI, J. L. H. Efeitos de dois isolados do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre a muda larval e a sobrevivência de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari : Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.1, p.53 - 56, 1997.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Uso do *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivo da Universidade Federal Rural Rio de Janeiro**, v.15, n. 2, p.197-202, 1992.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. **Revista da Universidade Rural**- Série Ciências da Vida, v.16, n.1-2, p.41-47, 1994a.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Revista da Universidade Rural** - Série Ciências da Vida, v.16, n. 1-2, p. 49-55, 1994b.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus*. (Canestrini, 1887). **Revista da Universidade Rural** - Série Ciências da Vida, v.17, n. 1, p. 83-88, 1995.

BOMAN, H.G.; HULTMARK, D. Cell-Free immunity in insects. **Annuals Reviews Microbiology**, v.41, p.103-126, 1987.

BOMAN, H.G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annuals Reviews Immunology**, v.12, p.61-92, 1995.

BOYCEV, D.; RIZVANOV, K. Relation of *Botrytis cinerea* to ixodid ticks. **Zoologie Zeitschrift Ukranien**, v. 39, p. 460, 1960.

BRINTON, L.P.; W. BURGDORFER. Fine structure of normal hemocytes in *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae). **Journal Parasitology**, v.57, n.5 p.1110-1127, 1971.

BULLMAN G. M.; MUÑOS, M. E.; AMBRÚSTOLO, R. R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprehensiva y comparativa. **Veterinária Argentina**, v.8, n.127, p.3-15, 1996.

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

CARNEIRO, M.E. **Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Ixodoidea, Ixodidae) em diferentes estados nutricionais**. 1995. 84 f. Dissertação (Mestrado em Medicina veterinária – Parasitologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1995.

CARNEIRO, M.E.; DAEMON, E. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Ixodoidea, Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 13, n.3, p. 609-620, 1996.

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

CARNEIRO, M.E. **Influencia de três temperaturas constantes sobre os tipos celulares presentes na hemolinfa de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)**



(Ixodoidea: Ixodidae) em diferentes fases de desenvolvimento. 1999. 70 f. Tese (Doutorado em Medicina veterinária – Parasitologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1999.

CARNEIRO, M.E.; DAEMON, E. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) Koch, 1844 e de *Haemaphysalis* sp. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 3, n.2, p. 139-145, 2001.

CASTRO, A.B.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; VIEGAS, E.C. Eficácia “in vivo” do fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado 959) sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista da Universidade Rural – Série Ciência da Vida**, v. 19, n.1-2, p. 73-82, 1997.

CERENIUS, L.; THORNQVIST, P.; VEY, A.; JOHANSSON, M. W.; SODERHALL, K. The effect of fungal toxin destruxin E on isolated crayfish haemocytes. **Journal Insect Physiology**, v. 36, n.10, p. 785-789, 1990.

CHIGAGURE, N. L. N.; BAXTER, G. D.; BARKER, S. C. Microsatellite loci of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.24, n. 12, p.951-956, 2000.

CORREIA, A. C. B.; FIORIN, A. C.; MONTEIRO, A. C.; VERISSIMO, C. J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* D (Acari: Ixodidae) in stable cattle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, n. 2, p.189-191, 1998.

CROSSLEY, A. C. The cytophysiology of insects. **Advances in Insects Physiology**, v. 11, p. 117-222, 1975.

DAVID, L; WEISER, J. Role of hemocytes in the propagation of a microsporidian infection in larvae of *Galleria mellonella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.63, n. 2, p. 212-213, 1994.

DRESNER, E. The toxic effect de *B. bassiana* (Bals) Veil on the insect. **Journal of the New York Entomological society**, v. 58, p. 269-278, 1950.

DOLP, R.M. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Qualitative and quantitative studies of hemocytes. **Journal of Medical Entomology**, v. 7, n. 3, p. 277-288, 1970.

DUNN, P.E. Biochemical aspects of insect immunology. **Annual Review Entomology**, v.31, p.321- 339, 1986.

FARIAS, N. A.; STOBBE, N. S.; CHRISTOVÃO, M. L.; PERRI, S. H. V.; COSTA, A. J. Influencia das condições climáticas da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil, sobre os estágios não parasitários do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodida). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, n. 2, p.67-77, 1995.

FERNANDES, E. K. K.; COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Jornal Brasileiro de Microbiologia**, v.44, n.4, p.270-274, 2004.

FERNANDES, F. F. Toxicological effects and resistance to pyrethroids in *Boophilus microplus* from Goiás, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 538-543, 2001.

FOGAÇA, 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.

FRANCHINI, A.; FONTANILI, P.; OTTAVIANI, E. Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production. **Comparative Biochemistry Physiology - B**, v. 110, n.2, p.403-407, 1995.

FRAZZON, A. P. G.; JUNIOR, I. S. V.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro Assessment of *Metarhizium Anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus Microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.94, n. 1- 2, p.117-125, 2000.

GENG, C.; DUNN, P. E. Plasmacytes depletion in larvae of *Manduca sexta* following injection of bacteria, **Developmental and Comparative Immunology**, v.13, n. 1, p.17-23, 1989.

GIANNOTTI, E.; CAETANO F.H. A comparative study of the hemocytes of *Atta laevigata* adults (Formicidae: Myrmicinae). **Revista Brasileira de Genética**, v.8, n.1, p.37-45, 1985.

GIANNOTTI, E.; CAETANO F.H. Caracterização morfológica dos hemócitos de *Polistes lanio lanio* (Hymenoptera, Vespidae) durante o desenvolvimento pós-embrionário. **Revista Brasileira de Biologia**, v.51, n.1, p.179-184, 1990.

GINDIN, G.; SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. The susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, n.1, p. 111-118, 2001.

GILLESPIE J. P.; KANOST, M. R. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review Entomology**, v.42, p.611-642, 1997.

GOMES, A. Controle do carrapato do boi: um problema para quem cria raças européias. Embrapa de gado de corte. Campo Grande, MS, n. 31, Agosto, 1998.

GONZALES, J.C. **O controle dos carrapatos dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 104p 1975.

GONZALES, J.C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Can.1887) (Revisão histórica e conceitual). **A Hora Veterinária**, n.125, p.23-28, 2002.

GUPTA, A. P. Hemocyte types: their structure, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance. In: A. P. Gupta, *Insect hemocytes*. Cambridge University Press, 1979.

GUPTA, A. P.; SUTHERLAND, D. J. In vitro transformations of the insect plasmacytes in some insects. **Journal Insect Physiology**, v. 12, n. 11, p. 1369-1375, 1966.

INOUE, N.; HANADA, K.; TSUJI, N.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae). **Journal Medical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 514-519, 2001.

HACKMAN, R. H. Structure and function in the ticks' cuticles. **Annuals Reviews Entomology**, v.27, p.75-95, 1982.

HORN, S. C.; ARTECHE, C. C. P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 4, n. 23, p. 12-32, 1985.

HORTON, J.; RATCLIFFE, N. A.; Evolução da imunidade *In*: ROITT, I. **Imunologia**. 6. ed. Editora Manole, Sao Paulo, 2003. cap. 13, p. 211-233.

HOOGSTRAAL, H. *In*: **Parasites, pests and predators**. GAAFAR, S.M., HOWARD, W.E.; MARSIL, R.E. Ed. Elsev., 575 p. 1985.

HUNG, S. Y.; BOUCIAS, D. G. Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular recognition responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, n. 2, p.152-158, 1992.

HUNG, S. Y.; BOUCIAS, D. G.; VEY, A. J. Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense response of *Spodoptera exigua*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, n. 2, p.179-187, 1993.

HUXHAM, I. M.; LACKIE, A. M.; McCORKINDALE, N. J. Inhibitory effect of cyclodepsipeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on cellular immunity in insects. **Journal Insect Physiology**, v. 35, n.2, p. 97-105, 1989a.

HUXHAM, I. M.; HEALE, K. D. Z. S.; McCORKINDALE, N. J. In vivo and in vitro assays for pathogenicity of wild-type and mutant strains of *Metarhizium anisopliae* for three insect species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.53, n. 2, p.143-151, 1989b.

JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n.4, p. 458-464, 1998.

JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Response of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) to hemocoelic inoculation of *Borrelia burgdorferi* (Spirochetales). **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 2, p. 265-270, 2000.

JOHNS, R. OHNISHI, J.; BROADWATER, A.; SONENSHINE, D. E.; SILVA, A. M.; HYNES, W. L. Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge: immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 99-107, 2001a.

JOHNS, R. SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, n.9, p.857-865, 2001.

- JONES, J. C. Current concepts concerning insect hemocytes. **American Zoologist**, v. 2, p. 209-446, 1962.
- KAAYA, G.P.; RATCLIFFE N.A. Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important dipterans. **Journal Morphology**, v.173, p.351-365, 1982.
- KAAYA, G.P.; MWANGI, E. N.; OUNA, E. A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, n. 1, p.15-20, 1996.
- KAAYA, G. P.; GODWIN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. **Experimental and applied Acarology**, v.24, n. 12, p.913-926, 2000.
- LACKIE, A. M. Haemocytes behavior. **Advances in Insects Physiology**, v. 21, p.85-177, 1988.
- 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.
- LEVASHINA, E. A. Innate immune response of *Anopheles gambiae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 673-678, 2004.
- 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.
- LOPEZ, C.; CARBALLAL, M. J.; AZEVEDO, C.; VILLALBA, A. Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussates* (Mollusca: Bivalvia). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.69, n. 1, p.51-57, 1997.
- LOWENBERGER, C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 219-229, 2001.
- LUCKHART, S.; CUPP, M. S.; CUPP, E.W. Morphological and functional classification of the hemocytes of adult female *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). **Journal of Medical Entomology**, v.29, n.3, p.457-466, 1992.
- LUZ, C.; TIGANO, M. S.; SILVA, I. G.; CORDEIRO, C. M. T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 6, p. 839-846, 1998.
- MAYA-MONTEIRO C.M; DAFFRE, S; LOGULLO, C; LARA, F.A; ALVES, E.W; CAPURRO, M.L. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.47, p.36584-9, 2000.
- 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.

- MUTA, T.; IWANAGA, S. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v.8, n. 1, p.41-47, 1996.
- NAKAJIMA, Y.; Saido-Sakanaka, H.; Taylor, D.; Yamakawa, M. Up-regulated humoral immune response in the soft tick, *Ornithodoros moubata*. (Acari: Argasidae). **Parasitology Research**, v. 91, n. 6, p. 476-481, 2003.
- NAKAYAMA, K. NOMOTO, A. M.; NISHIJIMA, M.; MARUYAMA, T. Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 69, n. 2, p. 105–111, 1997.
- NORDENSKIOLD, E. Zur anatomie und histologie von *Ixodes reduvius*. **Zoologischer Anzeiger**, v.28, p.478-485, 1905.
- 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.
- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; CASSANELLI, S.; GENEDANI, S. Cytokines and invertebrate immune responses. **Biology of the Cell**, v. 85, n. 1, p. 87-91, 1995.
- PENNA, V. M. *Boophilus microplus*: a resistência genética do hospedeiro como forma de controle. Belo Horizonte: **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, v.4, p. 65, 1990.
- 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.
- PRASERTPHON, S.; TANADA, Y. The formation and circulation in *Galleria* of hyphal bodies of Entomophthoraceus fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 11, n. 2, p. 260-80, 1968.
- REIS, R. C. S.; MELO, D. R.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p.544-547, 2001.
- ROBERTS, D. W.; HUMBER, R.A. Entomogenous fungi. In: BARRON, G.L. **Biology of conidial fungi**, v.2, p.201-236,1981.
- RODRÍGUEZ, M.; PENICHER, M. L; MOURIS, A. E.; LABARTA, V. ; LORENZO LUACES, L.; RUBIERA, R.; CORDOVÉS, C.; SÁNCHEZ, P. A.; RAMOS, E.; SOTO A. et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm 86 antigen preparations. **Veterinary Parasitology**, v.57, n. 4, p.339-449, 1995.
- SILVA, J. B.; ALBUQUERQUE, C. M. R.; ARAÚJO, E. C.; PEIXOTO, C. A.; HURD, H. Immune defense mechanisms of *Culex Quinquifasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida Albicans* infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.76, n.4, p.257-262, 2000.

- SILVA, J. E. B.; BOLELI, I. C.; SIMÕES, Z. L. P. Hemocytes types total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. **Brazilian Journal of Biology**, v.62, n.4A, p.689-699, 2002.
- SONENSHINE, D.E. **Biology of Ticks**. Vol.1. Oxford University Press, NY. 1991.465p
- SOSA, G. D. R. Current status of the microbial control of agricultural pests with entomopathogenic fungi. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v.58, n.1-2, p.295-300, 1999.
- TAKLE, G. B.; LACKIE, A. M. Chemokinetic behaviour of insect haemocytes in vitro. **Journal of Cell Science**, v.85, n. 1, p. 85-94, 1986.
- TANADA, Y.; KAYA, H. K. **Insect Pathology**. Academic Press Inc. 1993. 517 p.
- TSILENEVA, V.A. Formed elements of the hemolymph of ixodid ticks. Dokl. Akad. Nauk. Tadzhik SSR, v.2, p.45-51, 1959.
- WIGGLESWORTH, V. B. **The principles of insect physiology**. 7<sup>o</sup> ed. New York: Chapman and Hall, 1959.
- 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.
- WOODRING, J. P. Circulatory systems. In: BLUM, M.S. **Fundamentals of insect physiology**. University of Georgia: Georgia. 1985. 598 p.
- XIA, Y.; DEAN, P.; JUDGE, A. J.; GILLESPIE, J. P.; CLARKSON, J. M.; CHANLEY, A. K. Acid phosphatases in the desert locust, *Schistocerca gregaria*, infected with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Insect Physiology**, v.46, n. 9, p.1249-1257, 2000.
- YAMASHITA, M.; IWABUCHI, K. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual micro cultures. **Journal of Insect Physiology**, v.47, n. 4-5, p.325-331, 2001.
- ZHIOUA, E.; YEH, M. T.; LEBRUN, R. A. Assay for phenoloxidase activity in *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis* and *Ixodes scapularis*. **Journal of Parasitology**, v.83, n. 3, p.553-554, 1997.

## ANEXOS

	<b>PÁGINA</b>
ANEXO I.....	59
ANEXO II.....	60

## ANEXO I

**Quadro 1.** Avaliação de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos Testemunha, controle negativo, inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio
Entre grupos	3785,777778	5	757,155556
Dentro dos grupos	501,8	174	2,883908
Correção total	4287,577778	179	
Comparação múltiplas de Tukey			
Tratamentos	Diferença média (95% )- IC		Valor de P
Testemunha vs. <i>B. bassiana</i>	13,6 (12,2- 14,7)		P < 0,0001
Controle negativo vs. <i>B. bassiana</i>	13,2 (11,9 -14,4)		P < 0,0001
<i>F. oxysporum</i> vs. <i>B. bassiana</i>	9,8 (8,5- 11,0)		P < 0,0001
<i>P. corylophilum</i> vs. <i>B. bassiana</i>	8,8 (7,5-10,0)		P < 0,0001
Testemunha vs. <i>M. anisopliae</i>	7,2 (5,9- 8,4)		P < 0,0001
Controle negativo vs. <i>M. anisopliae</i>	7(5,7- 8,2)		P < 0,0001
<i>M. anisopliae</i> vs. <i>B. bassiana</i>	6,2 (4,9- 7,4)		P < 0,0001
Testemunha vs. <i>P. corylophilum</i>	4,6 (3,4 - 5,9)		P < 0,0001
Controle negativo vs. <i>P. corylophilum</i>	4,4 (3,1- 5,6)		P < 0,0001
Testemunha vs. <i>F. oxysporum</i>	3,6 (2,4- 4,9)		P < 0,0001
<i>F. oxysporum</i> vs. <i>M. anisopliae</i>	3,5 (2,3- 4,8)		P < 0,0001
Controle negativo vs <i>F. oxysporum</i>	3,4 (2,1- 4,6)		P < 0,0001
<i>P. corylophilum</i> vs. <i>M. anisopliae</i>	2,5 (1,3- 3,8)		P < 0,0001
<i>F. oxysporum</i> vs. <i>P. corylophilum</i>	1 (-0,2- 2,2)		P = 0,2076
Testemunha vs. Controle negativo	0,2 (-1,- 1,5)		P 0,9948

F (razão de variância) = 262,544971 P < 0,0001

Valor Critico (Studentized range) = 4,0754,

Valor de q = 2,881808

Desvio padrão = 1,698207



## ANEXO II

**Quadro 1.** Avaliação de mortalidade de plasmatócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos Testemunha, controle negativo, inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Plasmatócitos	Coefficiente de correlação (r) / (r <sup>2</sup> )	P	Coefficiente de correlação
Testemunho	-0,59772 / 0,357269	= 0,0145	S
Controle negativo	0,776702 / 0,603267-	0,0004	S
<i>F. oxysporum</i>	-0,869767 / 0,756495	< 0,0001	S
<i>P. corylophilum</i>	-0,792443 / 0,627966-	= 0,0003	S
<i>M. anisopliae</i>	-0,943343 / 0,889897-	< 0,0001<	S
<i>B. bassiana</i>	= -0,521064 / 0,271508	= 0,0385	S

(S)= Significativo

**Quadro 2.** Avaliação de mortalidade de esferulócitos identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* dos grupos Testemunha, controle negativo, inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Esferulócitos	Coefficiente de correlação (r) / (r <sup>2</sup> )	P	Coefficiente correlação
Testemunho	-0,385142 / 0,148335	0,1407	N/ S
Controle negativo	-0,153015 / 0,023414	0,5716	N/ S
<i>F. oxysporum</i>	-0,736994 / 0,54316	0,0011	S
<i>P. corylophilum</i>	-0,8346 / 0,696557	< 0,0001	S
<i>M. anisopliae</i>	-0,888215 / 0,788926	< 0,0001	S
<i>B. bassiana</i>	-0,568307 / 0,322973	0,0216	S

(N/ S)= Não significativo