

# AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) INOCULADAS COM *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium corylophilum* OU *Fusarium oxysporum*\*

SANDRA B. DA SILVA<sup>1</sup>; VÂNIA RITA E.P. BITTENCOURT<sup>2</sup>

**ABSTRACT:**- SILVA, S.B. DA; BITTENCOURT V.R.E.P. [Evaluation of cellular response in engorged females of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) inoculated with *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium corylophilum* or *Fusarium oxysporum*]. Avaliação da resposta celular de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) inoculadas com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium corylophilum* ou *Fusarium oxysporum*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 15, n. 4, p. 151-156, 2006. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

The effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Penicillium corylophilum* or *Fusarium oxysporum* on the dynamic of hemocytes presented in the haemolymph of engorged females of *Boophilus microplus* was studied. The inoculation was carried out with conidia suspension of different fungi in the concentration of 10<sup>8</sup> conidia/ml. A negative control group was inoculated with 0.1% Tween 80 water solution and a testimony group was comprised of non inoculated ticks. The haemolymph samples were collected in 24, 48 and 72 hours post-challenge. In all the studied periods, prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes and oenocytoids were observed in the specimens inoculated with fungus and also in the controls groups (negative and testimony). Prohemocytes, plasmatocytes and spherulocytes were the most cells in the haemolymph. The absence of hemocytes 72h post-challenging was observed prior to the death of the specimens inoculated with *B. bassiana* suggesting a failure in the cellular response. Hyphae and conidia growth was observed in the samples treated with entomopathogenic fungi (*B. bassiana* or *M. anisopliae*). The groups treated with non entomopathogenic fungi (*P. corylophilum* or *F. oxysporum*) did not shown significant differences in relation to the negative control and testimony groups.

**KEY WORDS:** Hemocytes, *Boophilus microplus*, cellular response, biological control.

## RESUMO

Foi estudado o efeito de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Penicillium corylophilum* ou *Fusarium oxysporum* sobre a dinâmica celular de hemócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*. Para a inoculação foi utilizado uma suspensão de fungos na concentração de 10<sup>8</sup> conídios/ml. Foram formados ainda um grupo controle negativo inoculado com uma solução 0,1% de Tween 80 e um grupo testemunho (não inoculado). As amostras de

hemolinfa foram coletadas em 24, 48 e 72 horas pós-inoculação. Em todos os grupos foram identificados prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e oenocitóides. Prohemócitos, plasmatócitos e esferulócitos foram as células mais numerosas na hemolinfa. No grupo inoculado com *B. bassiana* foi constatado que após 72 horas, as únicas células observadas foram esferulócitos e células com morfologia alterada, indicando um comprometimento da resposta celular. Foi observado o crescimento de hifas e conídios na hemolinfa nos tratamentos com fungos entomopatogênicos (*B. bassiana*, *M. anisopliae*). No grupo tratado com *M. anisopliae*, mesmo não apresentando alteração na estrutura de população celular, foi observada mortalidade dos carrapatos. Os tratamentos com fungos não entomopatogênicos (*P. corylophilum* e *F. oxysporum*) não apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos controle negativo e testemunho.

\*Sob os auspícios do CNPq e CAPES/PROEX.

<sup>1</sup> Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB 58397-000.

<sup>2</sup> Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, pesquisadora do CNPq. E-mail: vaniabit@ufrj.br

**PALAVRAS-CHAVE:** Hemócitos, *Boophilus microplus*, resposta celular, controle biológico.

## INTRODUÇÃO

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). Vários tipos celulares foram caracterizados e identificados em diferentes espécies de carrapatos sendo utilizados principalmente características morfológicas, funcionais e bioquímicas (DOLP, 1970; BRINTON; BURGDORFER, 1971; CARNEIRO; DAEMON, 1996, 1997, 2001). Os tipos celulares frequentemente encontrados em artrópodes são prohemócitos, esferulócitos, granulócitos, plasmatócitos, adipohemócitos, oenocitóides.

Os hemócitos representam um importante papel no mecanismo de defesa dos carrapatos, e assim, como nos insetos, a fagocitose é uma das primeiras reações frente a um micro-organismo (ZHIOUA et al., 1997). Estas células são a base para o processo de retirada dos patógenos na hemolinfa, através do processo de fagocitose, nodulação, encapsulamento, além da produção de substâncias reativas de oxigênio e secreção de peptídeos com atividades antimicrobianas no local da infecção (LACKIE, 1988; LEVASHINA, 2004).

Em ixodídeos Carneiro e Daemon (1996, 1997) verificaram para larvas e ninfas a presença de cinco tipos celulares básicos: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e oenocitóides. Nos adultos foram identificados adipohemócitos, além dos tipos citados acima.

A resposta de ixodídeos a corpos estranhos foi avaliada a partir da reação celular de *Dermacentor variabilis* inoculado com cepa B31 de *Borrelia burgdorferi*, sendo observado um aumento de, aproximadamente, seis vezes da população de hemócitos, nas primeiras seis horas após inoculação (JOHNS et al., 2000). Em relação à utilização de fungos entomopatogênicos tem sido observadas alterações no número e tipo celular em artrópodes com na utilização de *Metarhizium anisopliae* (HUXHAM et al., 1989a).

Atualmente, o potencial patogênico deste fungo vem sendo testado em *Boophilus microplus* como alternativa de controle (BITTENCOURT et al., 1992, 1994, 1995). Em insetos foi observado que a invasão do fungo *M. anisopliae* causava uma inibição da resposta imune celular (HUXHAM et al., 1989a). Este fato tinha sido anteriormente observado por Prasertphon e Tanada (1968) em insetos utilizando os fungos *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar quantitativamente a resposta celular de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* inoculadas com *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Penicillium corylophilum* e *Fusarium oxysporum*.

## MATERIALEMETODOS

As fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* utilizadas no experimento foram coletadas após desprendimento natural de

um bovino artificialmente infestado, mantido na Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, do Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Os grupos foram formados por espécimes com pesos de aproximadamente  $280 \text{ mg} \pm 20$ , divididos em seis grupos experimentais: um grupo tratado com *B. bassiana* (isolado 986), *M. anisopliae* (isolado Ma 959), *P. corylophilum* ou *F. oxysporum*, grupo tratado com solução de tween 80 em água destilada estéril a 0,1% (controle negativo) e um grupo que não foi inoculado (testemunho). Cada grupo foi constituído por dez espécimes totalizando 60 carrapatos.

A inoculação da suspensão fúngica ou solução controle na região dorsal do idiossoma das fêmeas ingurgitadas foi feita com o auxílio de uma microseringa Hamilton de 10µl (Hamilton, Reno, NV) sendo administrado 1µl da suspensão fúngica na concentração  $10^8$  conídios/ml e solução de tween 80 em água destilada estéril a 0,1%. Posteriormente, os espécimes foram fixados em placas de Petri e mantidos em câmara climatizada com temperatura e umidade controladas ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\geq 80\%$  UR).

As amostras de hemolinfa utilizadas na confecção dos esfregaços foram obtidas 24, 48 e 72 horas após a inoculação, com a secção da região distal do tarso de uma ou mais patas com auxílio de tesoura oftálmica. Após a coleta em lâminas de vidro para microscópio, a gota de hemolinfa foi secada ao ar, fixada em álcool metílico (P. A) por 3 minutos e coradas por 20 minutos com corante de Giemsa a 0,02%. As células foram identificadas com auxílio de um microscópio ótico Inalh com aumento de 400 e 1000x. Foram contadas cem células em diferentes campos da lâmina, seguindo sempre da esquerda para direita e de cima para baixo. A caracterização morfológica foi feita com base na classificação Jones (1962) e revisões de Arnold (1974) e Gupta (1979).

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.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados cinco tipos celulares presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* em todos os grupos estudados: prohemócito (PR), esferulócito (ES), granulócito (GR), plasmatócitos (PL) e oenocitóide (OE).

### Prohemócitos

O número de prohemócitos encontrados no grupo inoculado com *B. bassiana*, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo testemunha e controle negativo no terceiro dia após a inoculação, período em que não foi mais observada a presença deste tipo celular na hemolinfa. Foi também observada diferença significativa entre os dois primeiros dias analisados e o terceiro dia após inoculação evidenciando a diminuição acentuada do número destas células, chegando a zerar no último dia de coleta (Tabela 1). A ausência de células na hemolinfa ocorreu após período de 48 horas sugerindo imunossupressão

do sistema de defesa que pode está associado a produção e secreção de enzimas pelo fungos *B. bassiana*, alterando componentes celulares da hemolinfa (HUNG, 1993). O grupo inoculado com *M. anisopliae* também apresentou variações em relação ao número de células (Tabela 1).

O tipo de inóculo pode interferir, pois dependendo de tipo utilizado, o organismo pode responder de forma diferenciada, fato observado por Inoue et al. (2001) que também não registrou alteração significativa da estrutura da população de células após inoculação de gotículas de poliestireno fluorescente em *Ornithodoros moubata*. O mesmo padrão foi observado na população de células em *Manduca sexta* inoculadas com gotas de látex. A inoculação de bactérias provocou a depressão de plasmatócitos (GENG; DUNN, 1989).

O alto número de prohemócitos no grupo inoculado com *B. bassiana* em relação aos outros grupos no início sugere 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 por este fungo. Normalmente estas células são encontradas em pequenas quantidades, apesar de ser responsável pela origem dos outros tipos celulares através de sua diferenciação em outros tipos celulares, situação observada na maioria dos insetos (ARNOLD, 1974).

O número de células identificadas nos grupos inoculados com *F. corylophilum* e *P. oxysporum* não apresentaram diferença significativa entre as médias (Tabela 1). O baixo número de prohemócitos encontrados no presente estudo corrobora as afirmações de Carneiro (1995) para *R. sanguineus* adultos. Durante o estudo não foi observada modificação significativa na estrutura da população destas células, não sendo também identificada a presença de conídios ou mesmo hifas na hemolinfa, sugerindo um processo de fagocitose rápida e eficiente pelo organismo do carrapato.

### Plasmatócitos

A amplitude de variação destas células pode ser encontrada na Tabela 1. Com exceção do segundo dia de coleta, o

grupo inoculado com *M. anisopliae* apresentou diminuição progressiva deste tipo celular. A diminuição no número de células também foi observada para o grupo inoculado com *B. bassiana*. Embora o grupo tratado com *M. anisopliae* tenha apresentado diminuição na média das células, não foi possível afirmar que o sistema imune do carrapato tenha sofrido algum tipo de influência, como observado no grupo inoculado com *B. bassiana*.

No grupo tratado com *F. oxysporum* e *P. corylophilum* foram observadas oscilações entre os diferentes dias de análise, o que pode ser associado ao seqüestro de células para formação de nódulos, aspecto mencionado por Crossley (1975), sendo um dos motivos responsáveis pelo número irregular dos tipos celulares na hemolinfa.

A média dos plasmatócitos dos grupos tratados com *F. oxysporum* e *P. corylophilum* não diferiram significativamente do controle, em todo período avaliado, mesmo as médias dos grupos tratados sendo inferiores aos grupos testemunha e controle negativo. Este fato pode ser atribuído à resposta celular, devido ao seqüestro destas células para a resposta celular com a formação de nódulos nos tecidos e órgãos, 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.

### Granulócitos

Nos carrapatos inoculados com *M. anisopliae*, este tipo celular apresentou aumento acentuado 72 horas após inoculação, enquanto no grupo tratado com *B. bassiana* após 48 horas, seguido por uma diminuição, culminando na ausência de células nas amostras coletadas após 72 horas (Tabela 1).

Em relação à dinâmica, a diminuição nas médias destas células foram descritas por Silva et al. (2000) ao observar a resposta celular em mosquitos (*Culex quinquefasciatus*) quando inoculado com *Candida albicans*, sendo constatada a diminuição de granulócitos, ao contrário da população de plasmatócitos, que aumentou. Foi observada ainda a fagocitose

Tabela 1. Tipos celulares identificados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* em diferentes tempos após inoculação com fungos entomopatogênicos e dos grupos testemunha (sem inoculação) e controle negativo (inoculado com água e tween 80 a 0,1%).

Tipo celular	Horas após inoculação	Testemunho $\bar{x} \pm sd$	Controle negativo $\bar{x} \pm sd$	<i>Metarhizium anisopliae</i> $\bar{x} \pm sd$	<i>Beauveria bassiana</i> $\bar{x} \pm sd$	<i>Fusarium oxysporum</i> $\bar{x} \pm sd$	<i>Penicillium corylophilum</i> $\bar{x} \pm sd$
Prohemócitos	24	3,60 $\pm$ 3,20 A a	8,40 $\pm$ 4,58 A a	6,30 $\pm$ 7,75 A a	16,30 $\pm$ 13,77 A a	3,70 $\pm$ 4,95 A a	3,80 $\pm$ 3,29 A a
	48	5,80 $\pm$ 6,37 A a	4,20 $\pm$ 3,68 A a	0,30 $\pm$ 0,67 A a	6,60 $\pm$ 4,88 AB a	5,60 $\pm$ 3,60 A a	1,90 $\pm$ 2,18 A a
	72	9,10 $\pm$ 6,42 A a	8,20 $\pm$ 5,67 A a	4,80 $\pm$ 6,73 A ab	0,0 $\pm$ 0,00 B b	2,30 $\pm$ 2,45 A ab	5,10 $\pm$ 6,85 A ab
Plasmócitos	24	51,90 $\pm$ 15,42 A a	52,20 $\pm$ 8,78 A a	57,5 $\pm$ 9,12 A a	35,40 $\pm$ 19,83 A ab	24,70 $\pm$ 15,51 A b	37,50 $\pm$ 12,09 A ab
	48	44,60 $\pm$ 19,43 A a	58,50 $\pm$ 23,43 A a	69,80 $\pm$ 27,28 Aa	11,30 $\pm$ 7,93 AB b	43,70 $\pm$ 11,06 A bc	48,70 $\pm$ 16,60 A ac
	72	42,90 $\pm$ 9,22 A a	51,60 $\pm$ 19,18 A a	48,50 $\pm$ 12,31 A a	0,00 $\pm$ 0,00 B b	39,70 $\pm$ 23,97 A a	37,10 $\pm$ 14,56 A a
Granulócitos	24	4,70 $\pm$ 8,27 A a	21,00 $\pm$ 12,98 A b	8,40 $\pm$ 9,30 A ab	12,20 $\pm$ 11,97 A ab	8,30 $\pm$ 6,98 A ab	3,00 $\pm$ 5,37 A a
	48	11,40 $\pm$ 9,54 A a	10,80 $\pm$ 6, 60A a	4,70 $\pm$ 4,52 A a	16,80 $\pm$ 18,44 A a	6,10 $\pm$ 8,17 A a	2,80 $\pm$ 3,39 A a
	72	12,80 $\pm$ 8,34 A ab	11,00 $\pm$ 9,39 A ab	17,80 $\pm$ 14,83 A a	0,00 $\pm$ 0,00 B b	3,00 $\pm$ 4,40 A ab	6,00 $\pm$ 7,92 A ab

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna, dentro do mesmo tipo celular; letras minúsculas referem-se à comparação entre tratamentos. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis ( $p > 0,05$ ).

dos conídios inoculados e formação de nódulos na parede dos tecidos após um período de 72 horas. Entretanto, em nossos estudos, esta avaliação não foi realizada para a comprovação do seqüestro destas células da circulação como citado anteriormente.

O fungo *B. bassiana* durante seu desenvolvimento produz compostos que, além de inibir a produção de pseudópodes, afeta a dispersão destas células, característica muito importante para o reconhecimento de corpos estranhos no organismo do hospedeiro. Dependendo da cepa utilizada, a quantidade de células utilizadas no inóculo também pode apresentar diferentes efeitos sobre a população de hemócitos (HUXHAM et al., 1989)

Johns et al. (1998) ao pesquisarem o mecanismo de defesa de *D. variabilis* inoculados com diferentes bactérias, verificaram 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.

Tanto granulócitos como plasmatócitos são responsáveis pela fagocitose de corpos estranhos na hemolinfa e dependendo do potencial patogênico, estes microorganismos são retirados mais ou menos rapidamente da hemolinfa (CROSSLEY, 1975). Este fato pode explicar a grande variabilidade e oscilação na frequência destas células.

### Esferulócitos

No grupo tratado com *M. anisopliae*, o número de esferulócitos não apresentou diferença significativa em relação ao grupo testemunha. Esta média sugere que ao invés do organismo responder a infecção, *M. anisopliae* passou pelo organismo do carrapato sem ser reconhecido como corpo estranho e/ou inibiu uma resposta celular efetiva, pois o número de células permaneceu sempre inferior ao grupo testemunha (Tabela 2).

A imunossupressão provocada pelo fungo foi citada por Huxham et al. (1998a) como relacionada à liberação de destruxinas produzidos por *M. anisopliae* atuando sobre a resposta celular em insetos. Esta substância está associada à redução na formação dos agregados celulares, provocando acentuada redução na formação de nódulos e não ativação da cascata de profenoloxidase.

No tratamento com *B. bassiana* foi observada 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. Hung et al. (1993) ao comparar a atuação de *C. albicans* e *B. bassiana* em *Spodoptera exigua* relatam que mesmo tendo sido rapidamente fagocitado por granulócitos após inoculação, os conídios de *B. bassiana* não foram destruídos, sendo observadas hifas na circulação e diminuição no número de células circulantes, sugerindo que este fungo é resistente ao processo de fagocitose.

Nos grupos tratados com *P. corylophilum* e *F. oxysporum*, mesmo apresentando variações no número de células, não houve diferença significativa entre os grupos controle negativo e testemunha, sugerindo uma resposta rápida com posterior normalização na contagem de células circulantes (Tabela 2).

A resposta celular envolve agregações celulares nas 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 ao grupo testemunha e controle negativo, nos primeiros dias após inoculação, por estarem desempenhando tal função. Silva et al. (2000), ao inocular *C. albicans* em insetos, constataram que o período de atividade fagocitária dos plasmatócitos e granulócitos no período de 6 a 18 horas, após inoculação, sendo este mecanismo diminuído após 24 horas.

No presente estudo a primeira observação foi realizada 24 horas após inoculação, sendo observado um número pequeno destes tipos celulares em relação ao grupo testemunha e controle negativo, devido a possível mobilização destas células para realização de fagocitose, formação de agregados ou nódulos. Durante o estudo também foi observado um grande

Tabela 2. Tipos celulares encontrados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* em diferentes tempos após inoculação com fungos entomopatogênicos e dos grupos testemunha (sem inoculação) e controle negativo (inoculado com água e tween 80 a 0,1%).

Tipo celular	Horas após inoculação	Testemunha $\bar{x} \pm sd$	Controle negativo $\bar{x} \pm sd$	<i>Metarhizium anisopliae</i> $\bar{x} \pm sd$	<i>Beauveria bassiana</i> $\bar{x} \pm sd$	<i>Fusarium oxysporum</i> $\bar{x} \pm sd$	<i>Penicillium corylophilum</i> $\bar{x} \pm sd$
Esferulócitos	24	25,90±11,17 A ab	16,00±8,83 A ab	19,30± 12,33 A ab	9,00± 5,93 A a	39,60± 16,44 A b	45,10± 12,78 A b
	48	18,90± 16,68 A ab	15,60±10,72 A ab	12,20± 12,56 A ab	4,80± 8,12 A b	37,60± 13,74 A a	31,60± 16,30 A a
	72	23,20±13,25 A a	10,70± 4,32 A ab	13,50±13,82 A ab	0,30± 0,95 A b	16,90±13,04 A ab	38,50± 19,43 A a
Oenocitoides	24	0,60 ± 1,26 A a	0,20± 0,63 A a	0,20± 0,63 A a	0,60± 1,26 A a	0,40± 0,84 A a	0,40± 0,84 A a
	48	0,50± 1,08 A a	0,00± 0,00 A a	0,30± 0,67 A a	0,30± 0,95 A a	0,00± 0,00 A a	0,00± 0,00 A a
	72	1,30±1,83 A a	0,00±0,00 A a	0,00± 0,00 A a	0,00± 0,00 A a	0,10± 0,32 A a	0,00± 0,00 A a
Células não identificadas	24	8,10± 5,84 Aa	2,20± 3,61 Aa	8,30± 8,72 Aa	4,90± 8,29 Aa	5,60± 5,42 A a	3,90± 5,45 A a
	48	4,90± 4,51 Aab	0,00± 0,00 Aa	6,50± 7,66 Aab	22,40± 17,17 Ab	4,80± 6,61 A ab	10,70± 10,17 A ab
	72	6,40± 3,92Aa	7,30± 7,89 Aa	10,70± 9,23 Aa	1,00± 2,54 Ba	6,80± 8,02 A a	5,90± 5,69 A a

Letras maiúsculas referem-se a análise entre as linhas da mesma coluna, dentro do mesmo tipo celular; letras minúsculas referem-se à comparação entre tratamentos. Letras iguais não apresentam diferenças significativas, segundo teste Kruskal Wallis ( $p > 0,05$ ).



número de grânulos na hemolinfa, sugerindo a atuação desta célula na resposta imune pelo processo de degranulação.

### Oenocitóides

Estas células foram encontradas em pequenas quantidades em todos os grupos estudados. Nos grupos inoculados com fungos, apesar de apresentarem média superior à observada no grupo inoculado com água e tween 80 (controle negativo), não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Numericamente este tipo celular parece não ter sofrido influência pela presença de conídios na hemolinfa. Contudo, devido ao fato de ser uma célula com atividade relacionada à ativação da cascata de profenoloxidase e não ao processo de fagocitose, há a necessidade de uma avaliação posterior direcionada para estes aspectos. Mesmo em carrapatos que não foram desafiados com a inoculação de corpos estranhos, este tipo celular é considerado pouco comum, conforme relatado por Brinton e Burgdorfer (1971) em *D. andersoni stalis* (Tabela 2).

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.

No grupo inoculado com *B. bassiana* foi reforçado sua característica imunossupressora sobre a população de células semelhante ao observado para os outros tipos celulares (Tabela 2). Nos grupos inoculados com fungos não entomopatogênicos, apesar de apresentarem média superior à observada no controle negativo, não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

### Células não identificadas

Em todos os grupos estudados foram encontradas várias células apresentando características indeterminadas que impossibilitaram sua identificação. Este tipos são geralmente encontradas na hemolinfa, cuja população de células durante o período de ingurgitamento, sofre uma intensa atividade de divisão celular (TSILENEVA, 1959).

Apesar da variação no número destas células nos diferentes dias estudados não ser considerada significativa, exceto no grupo tratado com *B. bassiana*, foi observada acentuada variação entre as médias nos diferentes dias de análise tanto no grupo testemunha como controle negativo. 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 (Tabela 2).

No grupo inoculado com *B. bassiana* foi observada diferença significativa em relação ao controle negativo na segunda coleta, como também entre os dias dentro deste mesmo tratamento (Tabela 2), enquanto o número de hemócitos diminuía nas coletas posteriores, o número de células não identificadas aumentava, levando a crer que estas células tenham tido sua morfologia alterada pela presença do fungo na

hemolinfa, situação observada por Hung et al. (1993) em *Spodoptera exigua*.

Além da alteração na população de células da hemolinfa, outra característica que evidencia o potencial patogênico dos fungos, foi a mortalidade progressiva de espécimes estudados.

O grupo inoculado com *B. bassiana* começou a apresentar mortalidade das amostras a partir do terceiro dia de coleta, período utilizado para a execução da análise estatística, com perda total do grupo formado no quinto dia após inoculação, enquanto nos espécimes inoculados com *M. anisopliae* foi observada mortalidade a partir do sétimo dia, se estendendo até décimo primeiro dia após inoculação. Resultado semelhante ao apresentado por Bittencourt et al. (1995) em fêmeas de *B. microplus* tratados com *M. anisopliae*, que mesmo sem haver inoculação do fungo, as fêmeas apresentaram mortalidade a partir do sétimo dia após inoculação. Dados diferentes foram observados por Frazzon et al. (2000), que com metodologia similar a Bittencourt et al. (1995), verificaram 100% de mortalidade em fêmeas de *B. microplus* no período de duas semanas após exposição aos conídios de *M. anisopliae* (isolado E6S1), mostrando que isolados diferentes podem provocar respostas distintas.

Os carrapatos do grupo tratado com *F. oxysporum* e *P. corylophilum* apresentaram período de vida de aproximadamente de 14 dias, enquanto os grupos testemunha e controle negativo sobreviveram por aproximadamente vinte dias. 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.

Considerando as variações celulares observadas podemos concluir que os fungos não entomopatogênicos não provocaram um estímulo imunológico duradouro ou expressivo o suficiente para provocar alteração na estrutura da população de hemócitos, sendo, estes, rapidamente retirados de circulação. *Beauveria bassiana*, diferentemente de *M. anisopliae*, provocou inibição acentuada da resposta celular que foi manifestada pela diminuição acentuada dos hemócitos culminando na ausência de células na hemolinfa.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLD, J.W. The hemocytes of insects. In: ROCKSTEIN, M (ed.). *The Physiology of Insecta*. New York: Academic Press, 1974. v.5. p.201-254.
- 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). *Arquivos 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* sobre a fase não parasiti-

- tária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 16, n. 1-2, p. 49-55, 1994.
- 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 Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 17, n. 1, p. 83-88, 1995.
- BRINTON, L.P.; W. BURGDORFER. Fine structure of normal hemocytes in *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology*, v. 57, n. 5 p. 1110-1127, 1971.
- 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.; 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 Zoociências*, v. 3, n. 2, p. 139-145, 2001.
- CROSSLEY, A.C. The cytophysiology of insects. *Advances in Insects Physiology*, v. 11, n. 3, p. 117-222, 1975.
- 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.
- 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. Plasmotocytes depletion in larvae of *Manduca sexta* following injection of bacteria, *Developmental and Comparative Immunology*, v.13, n. 1, p.17-23, 1989.
- GILLESPIE J.P.; KANOST, M.R. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, v.42, p.611-642, 1997.
- GUPTA, A.P. Hemocytes types: their structure, synonymies, interrelationships and taxonomic significance. In: GUPTA, A.P. (ed.). *Insect Hemocytes*. Cambridge: University Press, 1979. p. 85-127.
- INOUE, N.; HANADA, K.; TSUJI, N.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 4, n. 38, p. 514-519, 2001.
- HUNG, S.Y.; BOUCIAS, D.G. 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 of 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* (Spirochetes). *Journal of Medical Entomology*, v. 37, n. 2, p. 265-270, 2000.
- JONES, J.C. Current concepts concerning insect hemocytes. *American Zoologist*, v.2, n. 2, p.209-246, 1962.
- LACKIE, A.M. Haemocytes behavior. *Advances in Insects Physiology*, v. 21, n. 2, 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.
- 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.260-280, 1968.
- SILVA, J.B.; ALBUQUERQUE, C.M.R.; ARAÚJO, E.C.; PEIXOTO, C.A.; HURD, H. Immune defense mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida Albicans* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 76, n.4, p.257-262, 2000.
- TSILENEVA, V.A. Formed elements of the hemolymph of ixodid ticks. *Doklady Akademii Nauk Tadzhikistan SSR*, v.2, n. 1, p. 45-51, 1959.
- 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.

Recebido em 24 de janeiro de 2006.

Aceito para publicação em 03 de outubro de 2006.