

**INFLUÊNCIA DE TRÊS TEMPERATURAS SOBRE OS TIPOS
CELULARES PRESENTES NA HEMOLINFA DE *Rhipicephalus
sanguineus* (LATREILLE, 1806) (IXODOIDEA: IXODIDAE) EM
DIFERENTES ESTADOS NUTRICIONAIS E DE
DESENVOLVIMENTO**

MARIA ELISA CARNEIRO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA -

PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

**INFLUÊNCIA DE TRÊS TEMPERATURAS SOBRE OS TIPOS
CELULARES PRESENTES NA HEMOLINFA DE *Rhipicephalus
sanguineus* (LATREILLE, 1806) (IXODOIDEA: IXODIDAE) EM
DIFERENTES ESTADOS NUTRICIONAIS E DE
DESENVOLVIMENTO**

MARIA ELISA CARNEIRO

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR:

Dr. ERIK DAEMON DE SOUZA PINTO

*Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Philosophiae Doctor em Medicina
Veterinária - Parasitologia Veterinária.*

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

MARÇO, 1999

TÍTULO DA TESE:

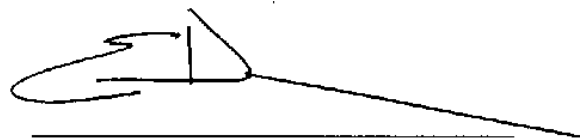
**INFLUÊNCIA DE TRÊS TEMPERATURAS SOBRE OS TIPOS
CELULARES PRESENTES NA HEMOLINFA DE *Rhipicephalus*
sanguineus (LATREILLE, 1806) (IXODOIDEA: IXODIDAE) EM
DIFERENTES ESTADOS NUTRICIONAIS E DE
DESENVOLVIMENTO**

AUTORA:

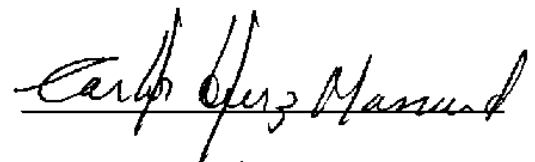
MARIA ELISA CARNEIRO

APROVADA EM: 03/03/1999

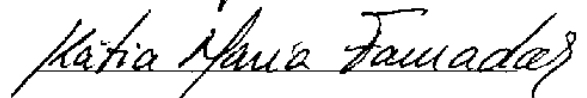
Dr. ERIK DAEMON DE SOUZA PINTO



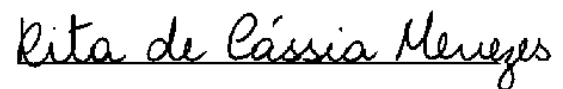
Dr. CARLOS LUIZ MASSARD



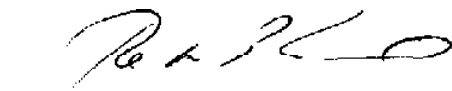
Dr. CARLOS WILSON



Dra. RITA DE CÁSSIA A.A. MENEZES



Dr. REGINALDO PEÇANHA BRASIL



A Deus, pela supremacia da sabedoria e assistência permanente durante esta jornada.

Aos meus pais, Tarcília e Valdemiro, pelos exemplos de vida, amor, força e trabalho, meu eterno amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Professor ERIK DAEMON DE SOUZA PINTO, pela orientação desse trabalho e pela amizade e apoio durante a realização de todo o Curso.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, pelos ensinamentos e convívio.

Ao Instituto de Zootecnia, pelo empréstimo dos coelhos utilizados na fase experimental.

Aos colegas de Curso, pelo companheirismo, sugestões e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho e realização de todo o Curso.

Aos funcionários da Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MARIA ELISA CARNEIRO, filha de Valdemiro Inácio Carneiro e Tarcília Martins Carneiro, nasceu no município de Muriaé, Estado de Minas Gerais.

Freqüentou curso primário e científico na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas em 1988 na Universidade Federal de Juiz de Fora obtendo o título de Licenciatura Plena em 1993 e o título de Bacharel em 1994.

Em 1993, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, a nível de Mestrado da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo em fevereiro de 1995, com aprovação da tese “Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas, ninfas e adultos de

Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Ixodoidea: Ixodidae) em diferentes estados nutricionais”.

Em março de 1995, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, a nível de Doutorado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Quanto aos tipos celulares	3
2.2. Quanto à temperatura	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1. Considerações gerais	16
4.2. Estádio de larva	23
4.3. Estádio de ninfa	30
4.4. Adultos	33

4.4.1. Fêmeas	33
4.4.2. Machos	42
4.5. Considerações finais	48
5. CONCLUSÕES	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

ÍNDICE DAS FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Tipos celulares encontrados na hemolinfa de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	18
FIGURA 2. Gotas de hemolinfa de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , mantidos a 18°C, sem nenhum tipo celular presente	19
FIGURA 3. Gotas de hemolinfa com vários tipos celulares	20
FIGURA 4. Células não definidas	22
FIGURA 5. Percentual de granulócitos encontrados em larvas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas	26

FIGURA 6. Percentual de esferulócitos (ES II) encontrados em larvas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas . 28

FIGURA 7. Percentual de granulócitos encontrados em ninfas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas 34

FIGURA 8. Percentual de plasmatócitos encontrados em fêmeas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas 37

FIGURA 9. Percentual de granulócitos encontrados em fêmeas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas 38

FIGURA 10. Percentual de esferulócitos (ES II) encontrados em fêmeas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas 39

FIGURA 11. Percentual de adipohemócitos encontrados em fêmeas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas 41

FIGURA 12. Percentual de plasmatócitos encontrados em machos mantidos em
três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas 45

FIGURA 13. Percentual de granulócitos encontrados em machos mantidos em
três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas 46

FIGURA 14. Percentual de esferulócitos (ES II) encontrados em machos mantidos
em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas 47

ÍNDICE DAS TABELAS

Pág.

TABELA 1. Número total e percentual de ocorrência dos tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em diferentes estádios nutricionais, mantidos em diferentes temperaturas	24
TABELA 2. Número total e percentual de ocorrência dos tipos celulares presentes na hemolinfa de ninfas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em diferentes estádios nutricionais, mantidos em diferentes temperaturas	31
TABELA 3. Número total e percentual de ocorrência dos tipos celulares presentes na hemolinfa de fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em diferentes estádios nutricionais, mantidos em diferentes temperaturas	35

TABELA 4. Número total e percentual de ocorrência dos tipos celulares presentes na hemolinfa de machos de *Rhipicephalus sanguineus* em diferentes estádios nutricionais, mantidos em diferentes temperaturas 43

TABELA 5. Percentual de ocorrência dos tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas, ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* em diferentes estádios nutricionais, mantidos em diferentes temperaturas 49

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o intuito de se verificar o efeito de três temperaturas (18,27 e 32°C) sobre os tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas, ninfas e adultos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806).

Seis tipos celulares básicos foram encontrados na hemolinfa, sendo estes denominados: Prohemócitos (PR), plasmatócitos (PL), granulócitos (GR), esferulócitos (ES), adipohemócitos (AD) e oenocitóides (OE).

Para o estágio de larva ocorreu uma queda acentuada de GR na temperatura de 18°C enquanto que a 27 e 32°C as quantidades destas células foram similares, sendo este o tipo celular mais abundante, o que poderia indicar o envolvimento destas células no metabolismo deste ínstar. Para ninfas este também foi o tipo celular mais abundante, sendo que neste ínstar, não ocorreram variações acentuadas para este tipo celular, o que poderia indicar que cada estágio de desenvolvimento apresenta um tipo de necessidade metabólica que se expressa nos tipos celulares presentes na hemolinfa;

esta presença seria então, em alguns casos, independente da temperatura. Para machos e fêmeas, os PL, GR, ES e AD foram, dependendo da temperatura e fase analisada, os tipos celulares mais encontrados, na hemolinfa destes ínstares.

A complexidade metabólica crescente ao longo do desenvolvimento, mostrou uma maior diversificação dos tipos hemocitários, o que leva a concluir que o efeito da temperatura sobre os hemócitos de *R. sanguineus* foi, dentro e entre cada estágio analisado, interagido às necessidades metabólicas deste ixodídeo.

SUMMARY

This work was accomplished with the aim of verifying the effect of three temperatures (18, 27 and 32°C) on the cellular types of the hemolymph of larvae, nymphs and adults of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806).

Six basic cellular types were found in the hemolymph, being these denominated: Prohemocytes (PR), plasmatocytes (PL), granulocytes (GR), esferulocytes (ES), adipohemocytes (AD) and oenocytoids (OE).

For the larval state it happened an accentuated fall of GR in the temperature of 18°C while at 27 and 32°C the amount of these cells was similar, being this the more abundant cellular type, what could indicate the involvement of these cells in the metabolism of this state. For nymphs this was also the more abundant cellular type, and in this state, it didn't happen great variations for this cellular type, what could indicate that each development state presents a type of metabolic need that is expressed in the cellular types founded in the hemolymph; this presence would be

then, in some cases, independent of the temperature. For males and females, PL, GR, is and AD was, depending on the temperature and analyzed phase, the found cellular types, in the hemolymph of state males and females.

The growing metabolic complexity along the development, showed a larger diversification of the types hemocytics, what takes to end that the effect of the temperature on the hemocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) was expressed inter and intra states, interacting with the metabolic needs of the tick.

1. INTRODUÇÃO

Os hemócitos são amplamente estudados na Classe Insecta, mas para os acarinos poucos trabalhos foram realizados, havendo escassez ainda maior no que diz respeito aos ixodídeos e subsequente à revisão bibliográfica realizada por CARNEIRO (1995), apenas os trabalhos de KUHN *et al.* (1994), KUHN & HAUG (1994), KUHN (1996) e CARNEIRO & DAEMON (1996, 1997) reportam informações sobre a morfologia e função dos elementos formadores da hemolinfa de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e *Ixodes ricinus*.

Vários autores citam a relevância do conhecimento da função e fatores imunológicos relacionados a estas células, com o propósito de controle dos parasitos nocivos ao homem e aos animais (WHITTEN, 1969; CROSSLEY, 1975; MENEZES & BASILE, 1982; DUNN, 1986; BOMAN e HULTMARK, 1987; LACKIE, 1988), fato este que deveria ser de ativo interesse para o estudo sobre o controle dos ixodídeos.

Rhipicephalus sanguineus, tem preferência pelo parasitismo a canídeos domésticos e silvestres (HOOGSTRAAL, 1985), mas pode também parasitar outros mamíferos, inclusive o homem (HEATH, 1979; GODDARD, 1989), sendo raramente encontrado em ambientes silvestres, em decorrência da sua especificidade pelo cão doméstico e sua tolerância ecológica restrita pela temperatura e umidade do ambiente (KOCH & TUCK, 1986). Esta espécie é considerada de grande importância médico-veterinária devido a transmitir agentes patogênicos, como *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma marginale*, *Rhickettsia* entre outros, como citado por BELLATO (1995).

Originário da África, *R. sanguineus* é largamente distribuído no mundo (DIAMANT & STRICKLAND, 1965), sendo amplamente distribuído no território nacional, principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul (LINARD & NAGEM, 1973). Este carrapato necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida, pois todas as mudas são realizadas fora destes; o acasalamento é realizado sobre o hospedeiro; as fêmeas então ingurgitam e deixam o hospedeiro, iniciando a oviposição sob pedras, entre tábuas ou frestas na parede. Após o período de incubação dos ovos, as larvas eclodem, fixam no hospedeiro e após ingurgitarem voltam ao ambiente onde passam por um processo de ecdise se transformando em ninfas, estas após novo processo de ingurgitamento no hospedeiro ficam e também sofrem ecdise dando origem aos adultos. A duração de cada fase e de todo o ciclo, bem como suas

alterações frente a diferentes temperaturas, são dados por BELLATO & DAEMON (1996, 1997).

As fases não parasitárias dos ixodídeos trioxenos, dependem muito das condições de temperatura e são escassos os trabalhos que correlacionem esta dependência às condições fisiológicas e metabólicas dos carrapatos. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar a influência de três temperaturas sobre os tipos celulares presentes na hemolinfa de *R. sanguineus* em diferentes estados nutricionais e de desenvolvimento, procurando correlacionar as alterações de cada etapa de seu ciclo biológico com aquelas encontradas para os tipos celulares.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Quanto aos tipos celulares

Embora muitos estudos sobre os tipos celulares presentes na hemolinfa dos artrópodes tenham sido desenvolvidos, a maioria destes está concentrado na Classe Insecta. Estas células são descritas por vários autores que se utilizam de variados padrões morfológicos, funcionais e bioquímicos, tornando-se comum encontrar o mesmo tipo de hemócito referido com diferentes nomes, em vários artrópodes, por diferentes autores.

Na tentativa de unificar os termos existentes, ARNOLD (1974) e GUPTA (1979), revisaram a literatura e de acordo com o sistema de classificação de JONES (1962), englobaram os hemócitos dos insetos em nove tipos básicos: prohemócito (PR), plasmatócito (PL), granulócito (GR), esferulócito (ES), adipohemócito (AD), cistócito (CI) ou coagulócito (CO), oenocitóide (OE), podócito (PO) e verminócito (VE), sendo que o último autor, após estudos com microscopia eletrônica, sugeriu que os PO e VE seriam formas variantes dos PL.

Embora numerosos estudos sejam dirigidos à morfologia, fisiologia e bioquímica dos hemócitos de insetos (EAST & HILLEN, 1980; KAAYA & RATCLIFFE, 1982; HALL, 1983; GIANNOTTI & CAETANO, 1985, 1990; MOSCONI *et al.*, 1989; AZAMBUJA *et al.*, 1991; LUCKART *et al.*, 1992); entre os mais recentes), informações similares sobre as células da hemolinfa de outros grupos de artrópodes, são escassas e dependentes das descrições utilizadas na Classe Insecta, sendo a classificação de JONES (1962), a mais utilizada pelos autores para todos estes diferentes grupos; por exemplo, na aranha *Eurypelma marxi*, SHERMAN (1973), descreveu GR, PL e OE com base nas semelhanças ultra-estruturais com os hemócitos de insetos; RAVINDRANATH (1974), descreveu seis classes de hemócitos associadas à terminologia de JONES (1962) aos PR, PL, GR, CI, ES e AD, no escorpião *Palamnaeus swammerdami*; e DANNHORN & SEITZ (1987), descreveram cinco diferentes tipos de hemócitos (PR, PL, GR, ES e CO) em Opiliones. Para os acarinos, segundo WOOLEY (1988), a literatura aponta que eles possuem os sete tipos descritos por GUPTA (1979), ou seja, PR, PL, GR, ES, AD, CI e OE.

Quanto aos carrapatos, os hemócitos, foram primeiramente descritos por NORDENSKIÖLD (1905) em *Ixodes reduvius*, como leucócitos cujo citoplasma é finamente granular. Mais tarde, DOUGLAS (1943), descreveu os hemócitos de *Dermacentor andersoni* como corpúsculos amebóides, cujo citoplasma contém dois tipos de inclusões; TSILENEVA (1959) descreveu os tipos celulares de *Boophilus calcaratus*, *Hyalloma detritum*, *Hyalloma anatolicum*, *Rhipicephalus sanguineus* e

Dermacentor spp., classificados como trofócitos, fagócitos e prohemócitos, concluindo que era difícil classificar estas células pela aparência e distribuição dos corpos de inclusões. BIRD *et al.* (1967), fizeram um breve relato dos hemócitos de *H. dromedarii*.

Subseqüentemente, DOLP (1970), quantificou e classificou os hemócitos de quatro espécies de carrapatos pertencentes aos gêneros *Hyalomma* e *Argas*, baseada na estrutura geral e efeito da coloração com corante Giemsa, em três categorias principais: PR, PL e ES. Já SONENSHINE (1970), citou que os hemócitos de *Ornithodoros kelleyi* como pequenas células esféricas que são encontradas em toda parte do corpo do carrapato, sem, contudo, descrevê-las; mais tarde CORY & YUNKER (1971), descreveram os hemócitos de *D. andersoni* como “células de composição mista”, ressaltando o aumento do número de células granulares no meio de cultura para arbovírus no final de quatro semanas; e de maneira geral, BALASHOV (1972), citou três tipos de trofócitos com grandes inclusões, fagócitos basofílicos, PR e OE nos ixodídeos; e EGGENBERGER *et al.* (1990), citaram a presença de GR e PL em *D. variabilis* em seu estudo sobre formação de cápsula por estes tipos celulares.

Características ultraestruturais dos hemócitos foram descritas por BRINTON & BURGDORFER (1971), para os tipos celulares - PR, ES, PL e OE - presentes na hemolinfa de *D. andersoni*; por AMOSOVA (1983), para os hemócitos (PR, PL e dois tipos de GR) presentes na hemolinfa de *H. asiaticum*; e por EL

SHOURA (1986, 1989) para os hemócitos de *Argas (Persicargas) arboreus* e *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus*, respectivamente, classificados como PR, PL e GR em ambas as espécies citadas.

A revisão bibliográfica apresentada acima foi citada no trabalho de Tese de CARNEIRO (1995); a partir deste período até o presente existem apenas os trabalhos de CARNEIRO & DAEMON (1996, 1997) que caracterizam morfológicamente os hemócitos presentes na hemolinfa de *R. sanguineus* e os de KUNH & HAUG (1994), KUHN (1994) e KUHN *et al.* (1996) que reportam os tipos celulares presentes na hemolinfa de *I. ricinus*, caracterizando dois tipos celulares - PL e GR - e a atividade mitótica destas células com ênfase à presença de tecido hemocitopoiético. Quanto a estudos sobre os componentes da hemolinfa, apenas o trabalho de ZAIJIE *et al.* (1991), retrata alterações nesta durante o período de diapausa de várias espécies pertencentes ao gênero *Dermacentor*, sobre sua composição protéica; e o de DALGLIESH & STEWART (1996), que relataram a influência da temperatura sobre a taxa de infecção de *Babesia bovis* e *B. bigemina* em larvas de *B. microplus*.

2.2. Quanto à temperatura

Historicamente, a relação da temperatura com os organismos tem sido uma das mais ativas áreas de estudo na fisiologia comparativa e ambiental. Experimentos têm envolvido a descrição dos efeitos desta ao nível de caracterização de

mecanismos bioquímicos e moleculares que estabeleçam a temperatura sensível, ótima e o limite de tolerância de adaptação de diferentes espécies. O papel da temperatura no padrão de estabilidade biogeográfica tem sido reconhecido, mas o mecanismo fisiológico e molecular responsável pela estabilização e manutenção deste padrão não é bem conhecido (SOMERO, 1995).

Os Arthropoda, como outros organismos vivos, vivem dentro de condições ambientais variáveis, nas quais a intensidade de fatores dominantes e suas combinações variam em diferentes graus, causando alterações reversíveis ou irreversíveis no metabolismo. Estas alterações têm como consequência a sobrevivência ou a morte de um organismo, afetando sua distribuição ecológica e sua dinâmica populacional (IVANOVICH *et al.*, 1992). De acordo com ROSS (1961), a temperatura corporal dos insetos, em geral, depende daquela do ambiente. Dentro de certos limites, eles podem alterar a temperatura do corpo, ou seja, em presença de altas temperaturas reduzem sua temperatura por evaporação da água da superfície e em presença de baixas temperaturas, ocorrem alterações químicas que possibilitam aumentarem sua temperatura corporal acima daquela do ambiente.

A maioria dos estudos relacionados com o efeito da temperatura sobre a hemolinfa dos insetos ou outros invertebrados, é direcionada ao efeito da baixa temperatura na redução da taxa metabólica que leva a maioria das espécies a entrar no estado de dormência (quiescência e/ou diapausa) que permite-lhes minimizar o uso de energia nos meses mais frios do inverno (JOANISSE & STOREY, 1994). Segundo

ROSALES *et al.* (1994) as injúrias causadas por temperaturas abaixo de zero podem ser de dois tipos: injúria pelo frio e injúria pelo congelamento, sendo que, a primeira, é relacionada à ruptura da membrana celular e ao mal funcionamento da regulação metabólica e, a segunda, inclui danos físicos e bioquímicos causados por formação interna de gelo, o que é considerado letal para célula, daí existirem estratégias para sobrevivência destes à baixas temperaturas que consistem em evitar a cristalização da água de seu corpo por produção natural de anticongelantes, como o glicerol por exemplo, em insetos que não toleram o congelamento; e, entre outros mecanismos, a indução de formação de gelo somente em compartimentos extracelulares em insetos que toleram o congelamento. Também STOREY *et al.* (1986) e GEHRKEN & SOUTHON (1997), citaram o acúmulo de glicerol como fator de sobrevivência em temperaturas abaixo de zero, enquanto DUMAN *et al.* (1991), caracterizaram as proteínas presentes na hemolinfa de larvas de *Tipula trivittata* que atuam inibindo a formação de gelo intracelular.

Outros trabalhos citam que alterações nas temperaturas podem ter um importante efeito sobre as propriedades de transporte de oxigênio na hemolinfa, como por exemplo, o estudo de ESHKY *et al.* (1996), onde citaram que espécies de decápodes, que habitam ambientes que são regularmente expostos à variações de temperatura, mostram a hemocianina com reduzida sensibilidade à temperatura; entretanto, para outras espécies cuja a variação ambiental é baixa, apresentam hemocianina com maior sensibilidade à altas temperaturas. Já CHIHANE & LAUGÉ

(1994), notificaram queda na eficiência reprodutiva do parasitóide *Trichogramma brassicae* em condições de altas temperaturas ambientais. CHEN *et al.*(1995) afirmam que a osmolaridade da hemolinfa de *Penaeus chinensis* diminui com o aumento da temperatura. JOANISSE & STOREY (1994), concluíram que a temperatura tem efeito sobre as enzimas mitocondriais de larvas das moscas *Eurosta solidaginis* (tolerantes ao congelamento) e *Epiblema sudderiana* (não tolerante ao congelamento), sendo que a regulação de alterações sazonais parece requerer uma resposta mais complexa que uma simples aclimação a curto prazo à temperatura.

Ainda outros trabalhos citam alterações na composição da hemolinfa dos insetos após infecção com bactérias e vírus (FISHER & GANESALINGAM, 1970), efeito da temperatura sobre o volume (EHLER *et al.*, 1986) e sobre o pH da hemolinfa (STOREY *et al.*, 1986).

Para o Filo Mollusca entretanto, o trabalho de FISHER *et al.* (1987) cita que elevadas temperaturas intensificam a pinocitose, a migração dos hemócitos e a fagocitose em ostras; em seus resultados concluem que ostras européias mantidas em altas temperaturas tem alterada a atividade dos hemócitos, porém não especificam os tipos celulares envolvidos; e o de CHU *et al.* (1993), cita a interrelação entre o potencial de defesa celular/humoral e a susceptibilidade da ostra *Crassostrea virginica* a trofozoítas de *Perkinsus marinus* nas temperaturas de 10, 15, 20 e 25°C, relacionando também, os tipos de hemócitos a efeitos destas temperaturas, concluindo que ostras mantidas em altas temperaturas tem alto percentual de granulócitos, alta

contagem total de hemócitos e atividade fagocítica e que nenhuma alteração foi observada na contagem total e percentagem de granulócitos entre os grupos tratados e controle. SANTARÉM *et al.* (1994) encontraram que o número e tipo de hemócitos granulares e agranulares de *Mytilus galloprovincialis* foi influenciado por fatores sazonais, citam ainda vários autores que afirmaram que alterações sazonais no ambiente são fatores que afetam o número, tipo e a capacidade defensiva dos hemócitos e que numerosas investigações documentam variações ambientais e sazonais nos constituintes da hemolinfa, que podem ser associadas ao ciclo reprodutivo e que o número de hemócitos circulantes é influenciado pela temperatura.

Informações sobre a hemolinfa dos carrapatos estão limitadas à descrições da morfologia e em menor grau das funções dos elementos formativos (BALASHOV, 1972) e inexistem trabalhos relacionando a influência da temperatura sobre os tipos celulares presentes na hemolinfa dos ixodídeos, bem como, estes são escassos também para a Classe Insecta. Em compensação, inúmeros são os trabalhos que relacionam este fator abiótico, como um dos mais importantes para o desenvolvimento dos carrapatos, evidenciando a significância das alterações provocadas pela temperatura sobre o ciclo biológico de várias espécies como, *Dermacentor (Anocentor) nitens* (DIAZ *et al.*, 1991; DESPINS, 1992; BASTOS *et al.* 1996), *B. microplus* (GLORIA *et al.*, 1993a,b), *B. annulatus* (OUHELLI *et al.*, 1982), *Amblyomma triguttatum* (GUGLIELMONE, 1992), *A. cajennense* (PRATA, 1998), *Rhipicephalus appendiculatus* (BRANAGAN, 1973; TUKAHIRWA,

1976), *Haemaphysalis longicornis*, *Ixodes holocyclus* e *R. sanguineus* (HEATH, 1979), *R. simpsoni* (BAIDU, 1987), *R. simus* e *Haemaphysalis spinulosa* (HUSSEIN & MUSTAFA, 1987), *R. sanguineus* e *R. turanicus* (MAHADEV, 1977) entre outros, sendo de senso comum a importância de tais estudos para medidas de controle.

Quanto a *R. sanguineus* os trabalhos de NUTALL (1915), SRIVASTAVA & VARMA (1964), SWEATMAN (1967), NASSAR *et al.* (1971), KOSHY *et al.* (1983), KOCH & TUCK (1986) e BELLATO & DAEMON (1997a,b), analisaram a influência da temperatura sobre vários parâmetros das fases não parasitária e/ou parasitária deste ixodídeo, oferecendo informações substanciais para a análise deste trabalho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado no Laboratório de Ixodologia da Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

A partir de larvas de *R. sanguineus*, obtidas de fêmeas da colônia estoque do Laboratório mantida a 27°C, foram feitas infestações artificiais em coelhos, segundo a técnica preconizada por NEITZ *et al.* (1971), ao estudar a biologia de *Ixodes rubicundus*. Foram utilizados ixodídeos com 15 a 20 dias, para obtenção de cada estado nutricional e de desenvolvimento analisado.

Os coelhos mestiços (Nova Zelândia x Califórnia) procedentes do setor de cunicultura do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, foram mantidos em abrigos

individuais e alimentados com ração Nutricoeelho¹, e água “*ad libitum*”, sendo utilizados sem distinção de sexo, porém, com peso entre 1,5 e 2,0 kg e sem contato prévios com produtos acaricidas ou outras infestações artificiais por carrapatos.

Com exceção das fêmeas ingurgitadas, que foram mantidas em placas de Petri médias (15 x 100 mm), todos os ínstares obtidos nas infestações foram acondicionados em seringas plásticas de 5 ml, cortadas na parte anterior e vedadas com algodão hidrófilo.

A partir das larvas ingurgitadas, a colônia utilizada foi dividida em três grupos de 600 larvas para o desenvolvimento das fases não parasitárias subseqüentes, sendo cada grupo mantido em estufa para BOD², nas temperaturas de 18, 27 e 32°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa de 80% e escotofase. A “*posteriori*”, as infestações foram sendo realizadas de acordo com o progresso obtido em cada temperatura utilizada.

As amostras de hemolinfa foram obtidas por secção das patas dos ixodídeos com auxílio de uma pinça de relojoeiro, estilete e tesoura, utilizando um microscópio estereoscópico³ para visualização da gota a ser coletada. O material foi coletado em lâminas (76 x 26 mm), previamente limpas com solução álcool/éter (50%) e secas com papel absorvente. Após coleta a gota de hemolinfa foi seca ao ar, fixada em metanol por três minutos e corada com corante Giemsa (2 gotas/ml de água destilada).

¹ Purina Nutrimento Ltda, Barra Mansa, RJ.

² Modelo 347 CDG, FANEM.

³ Modelo Carl Zeiss, antiga República Alemã.

A hemolinfa foi obtida de 40 exemplares/fase analisada, em cada grupo estudado, segundo a seguinte metodologia:

- . **Larvas** - um dia após a eclosão (L-1 DAEC)
 - 20 dias após a eclosão (L-20 DAEC)
 - ingurgitadas, um dia após a queda do hospedeiro (LI-1 DAQ)
- . **Ninfas** - um dia após a ecdise (N-1 DAE)
 - 20 dias após a ecdise (N-20 DAE)
 - ingurgitadas, um dia após a queda do hospedeiro (NI-1 DAQ)
- . **Fêmeas** - um dia após a ecdise (F-1 DAE)
 - 20 dias após a ecdise (F-20 DAE)
 - ingurgitadas, um dia após queda do hospedeiro (FI-1 DAQ)
 - ingurgitadas, sete dias após iniciar postura (FI-7 DAP)
 - ingurgitadas, ao término da postura = quenógina (FI-TP)
- . **Machos** - um dia após a ecdise (M-1 DAE)
 - 20 dias após a ecdise (M-20 DAE)
 - um dia após retirada do hospedeiro (M-1 DAR)
 - 20 dias após retirada do hospedeiro (M-20 DAR)

A visualização dos hemócitos foi feita com auxílio de um microscópio biocular modelo Dialux 20 EB⁴, enquanto a caracterização morfológica foi feita com

⁴ Leitz/Wetzlar, antiga República Alemã.

base na classificação de JONES (1962) e revisões de ARNOLD (1974) e GUPTA (1979), como proposto por CARNEIRO (1996, 1997).

A contagem foi feita através da observação das 20 primeiras células intactas encontradas na gota de hemolinfa de cada exemplar em cada estado nutricional e de desenvolvimento, resultando na contagem 800 células por estágio analisado em cada temperatura estudada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Considerações gerais

Preliminarmente à compreensão da significância funcional e/ou biológica dos hemócitos dos carrapatos é imperativo sabermos identificar os tipos celulares básicos e ter dados sobre sua distribuição relativa em carrapatos não infectados (DOLP, 1970). Em vista disso as características morfológicas e morfométricas de cada tipo celular encontrado na hemolinfa de *R. sanguineus* foi dada por CARNEIRO (1995), sendo estes denominados de acordo com a classificação de JONES (1962), como prohemócitos (PR), plasmatócitos (PL), granulócitos (GR), esferulócitos (ES), adipohemócitos (AD) e oenocitóides (OE). Houve necessidade de dividir os PR e ES em dois subtipos (PR I e PR II; ES I e ES II respectivamente) com o propósito de prover uma descrição concisa destas células.

É possível que um ou mais tipos representem diferentes períodos de desenvolvimento destas células, assim como é possível que estas alterações conduzam às futuras formas de transição observadas. A semelhança dos PR I e PR II, por exemplo, com os pequenos PL e GR respectivamente pode, segundo GUPTA (1979), indicar que se trate de alterações do desenvolvimento havendo um único tipo celular; o que vem a sugerir que o aparecimento dos PR I, após a presença dos PL, no presente trabalho, seja indicativo de que estas células sejam uma fase de desenvolvimento das primeiras. Os tipos celulares citados são demonstrados na Figura 1 e o percentual de cada tipo encontrado nos estádios e temperaturas analisadas, serão analisados posteriormente.

Para o estudo da variação hemocitária entre os estádios na temperatura de 18°C, houve necessidade de reiniciar o ciclo, pois este não se completou satisfatoriamente a esta temperatura e houve problemas com a coleta de hemolinfa de ninfas, onde nos esfregaços de hemolinfa dos exemplares obtidos na primeira infestação realizada, não ocorreram a presença de qualquer tipo celular (Figura 2), fato este que segundo BALASHOV (1972), pode ser explicado pela habilidade temporária dos hemócitos de tornarem-se imóveis e ligarem-se a fibras de tecido conectivo e membranas; em uma segunda infestação, entretanto as gotas de hemolinfa coletadas estavam repletas de células (Figura 3). De acordo com o trabalho de BELLATO & DAEMON (1997a), nesta temperatura foi obtida apenas a eclosão de três larvas, fato que, segundo eles, pode ter ocorrido devido a ser esta a temperatura limite para ocorrer este fenômeno ou devido à cepa utilizada ter sido menos tolerante à baixa temperatura, ou ainda devido a exposição sucessiva, a partir de larvas ingurgitadas à temperatura de 18°C.

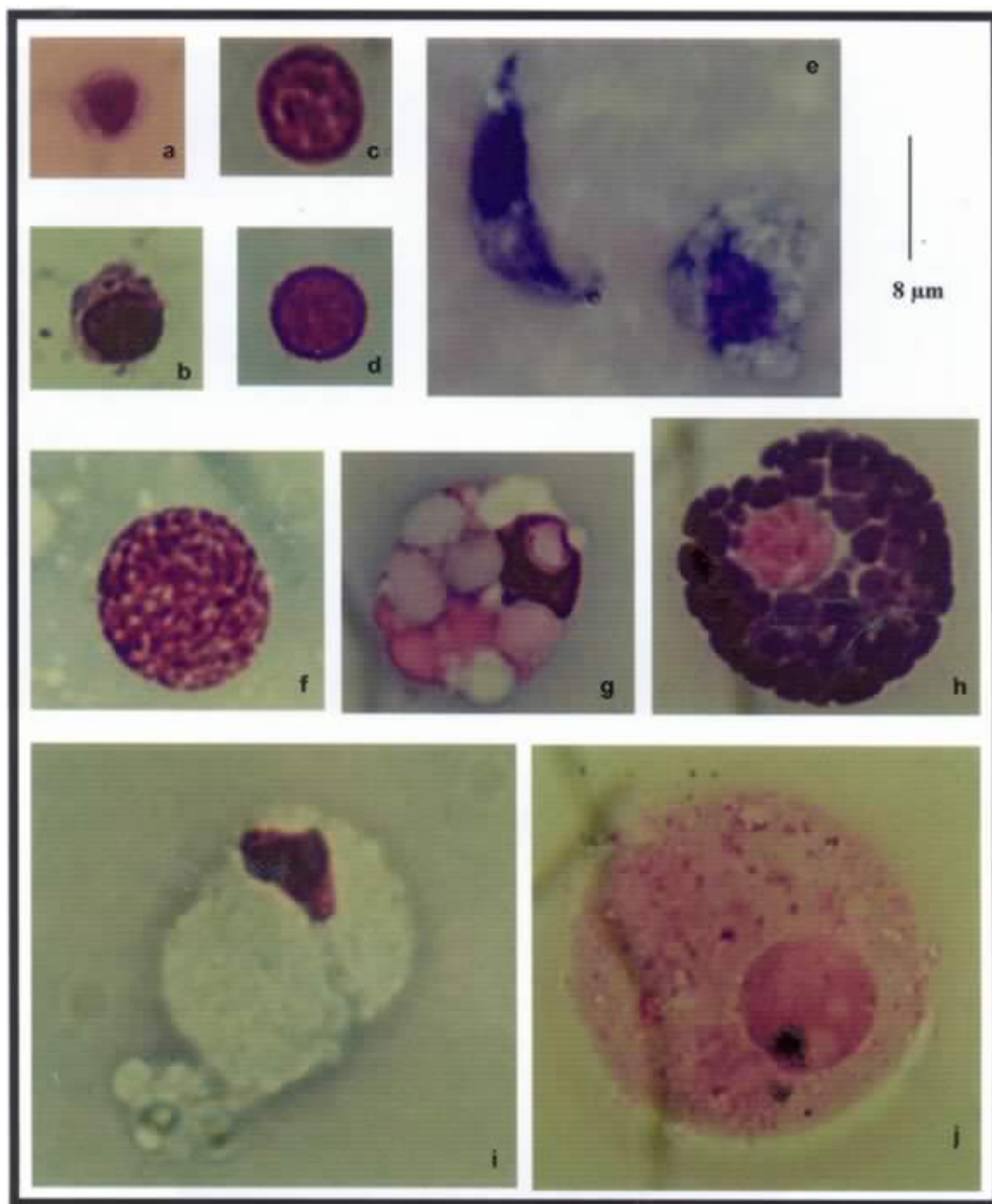


FIGURA 1. Tipos celulares encontrados na hemolinfa de *Rhipicephalus sanguineus*. a,b) Prohemócitos tipo I; c,d) prohemócitos tipo II; e) plasmatócitos; f) granulócito; g) esferulócito tipo I; h) esferulócito tipo II; i) adipohemócito; j) oenocitóide.

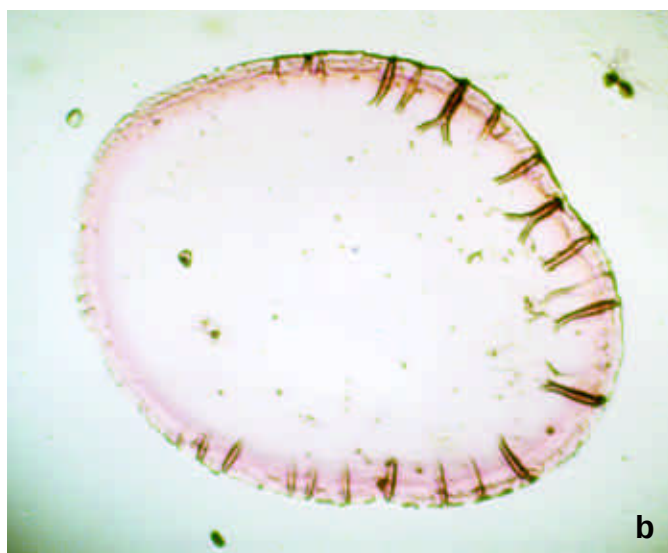
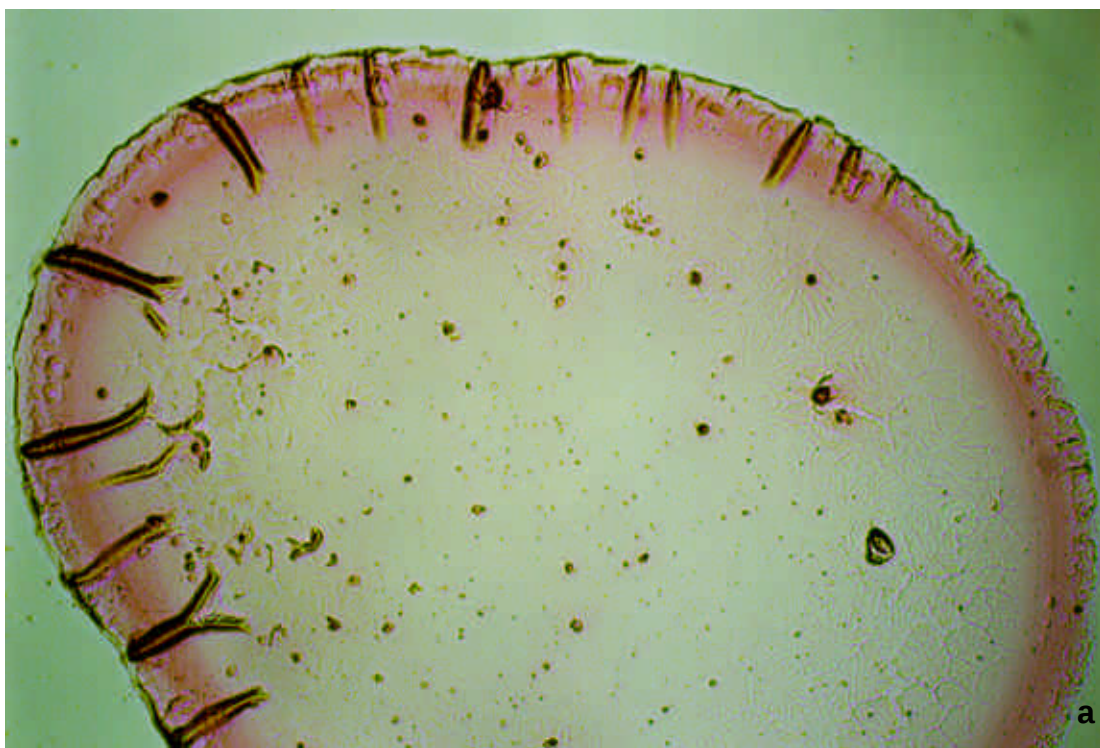


FIGURA 2. Gotas de hemolinfa de *Rhipicephalus sanguineus*, mantidos a 18°C, sem nenhum tipo celular presente. a) Aumento 10X; b) Aumento 6,5X.



FIGURA 3. Gotas de hemolinfa com vários tipos celulares. a) gota com muitas células; b) gota com poucas células. Aumento 10X.

Esta última suposição é confirmada pela observação de SWEATMAN (1967) de que temperaturas extremas (altas ou baixas) podem ser toleradas por curtos períodos, e também por HEATH (1979), que cita que ovos de *R. sanguineus* (provenientes de fêmeas mantidas nas temperaturas analisadas), foram capazes de suportar alta temperatura (38°C), mas incapazes de sobreviver à 18°C. Quanto a baixa eclodibilidade de larvas provenientes de ovos mantidos à baixas temperaturas, LONDT (1977), supõe que isto se deva à influência da temperatura na duração do período de incubação, sendo este prolongado, os ovos tem maior tempo para perder água através da evaporação antes de ocorrer eclosão. Em vista disto, a coleta de hemolinfa para larvas nesta temperatura foi realizada a partir de ovos mantidos a esta temperatura apenas após indicação (por meio da visualização da larva já formada no seu interior) de que estavam prestes a eclodir, o que levou em média, quatro a cinco dias.

O número total e a ocorrência dos tipos celulares são dados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4. A variação ocorrida no número total de células na temperatura de 18°C se deve à escassez (Figura 3b) ou grande número de células em lise (Figura 4a) nas diferentes fases analisadas. A lise celular pode ter sido provocada devido à desidratação, que GEHRKEN & SOUTHON (1997) citam como um dos principais mecanismos de injúria pelo frio.

As células não definidas, englobam células hialinas (Figura 4b), desintegradas (Figura 4c) ou escuras (Figura 4d) (CARNEIRO & DAEMON, 1996, 1997) e tiveram uma ocorrência variável entre as temperaturas analisadas. Também foram observados elementos não hemocíticos como fungos e bactérias (Figura 4e,f).

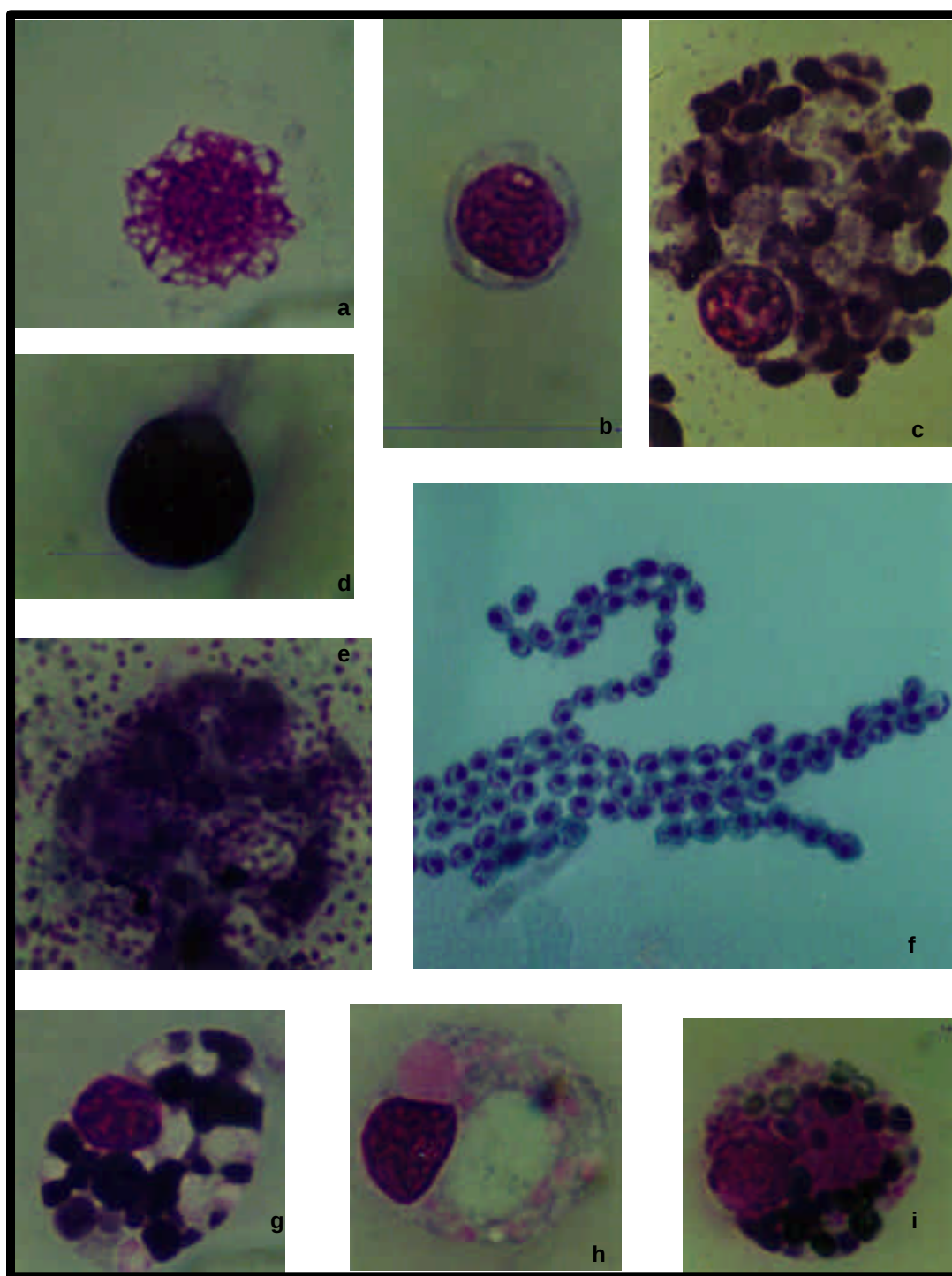


FIGURA 4. Células não definidas. a) Célula em lise; b) célula hialina; c) célula desintegrada; d) célula escura; e) bactérias; f) fungos; g,h,i) formas de transição (g = esferulócito tipo II/adipohemócito; h = esferulócito tipo I/adipohemócito; i = esferulócito tipo I/esferulócito tipo II).

Formas de transição (Figura 4 g, h, i) foram observadas somente no estágio de adultos, nas três temperaturas analisadas, fato este observado também por CARNEIRO & DAEMON (1997) em adultos deste ixodídeo mantidos à 27°C, contudo, segundo GUPTA (1979) não há consenso entre os autores sobre a extensão ou direção das transformações que ocorrem de um tipo celular a outro, havendo relatos de que os hemócitos podem se transformar de classe a classe de acordo com a exigência fisiológica do artrópode.

Os gráficos apresentados nas Figuras 5 a 14 apresentam a análise dos principais tipos celulares encontrados na hemolinfa de *R. sanguineus*, com o intuito de fornecer uma visão mais clara dos resultados obtidos.

4.2. Estádio de larva

Como pode ser observado na Tabela 1, no estágio de larva ocorreu a presença de AD apenas na temperatura de 18°C, sendo este tipo celular encontrado apenas logo após a eclosão, o que pode ser justificado, pela recente exposição dos ovos à temperatura de 18°C, e poderia estar associado ao fato de que, segundo GUPTA (1979), ocorre aparecimento dos AD na hemolinfa, por curtos períodos, de acordo com o estado fisiológico do inseto. Este fato também poderia indicar a formação de reservas calóricas a serem usadas numa situação de retorno da temperatura a patamares adequados ao desenvolvimento do ixodídeo.

TABELA 1. Número total e percentual de ocorrência dos tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas de *Rhipicephalus sanguineus* em diferentes estádios nutricionais, mantidos em diferentes temperaturas.

Tipo celular	Estádios/Temperatura (°C)								
	L-1DAEc			L-20DAEc			LI-1DAQ		
	18	27	32	18	27	32	18	27	32
PR I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PR II	2,9	2,4	3,7	2,5	2,5	2,0	3,0	3,2	2,0
PL	11,7	-	-	13,0	-	2,9	10,2	-	-
GR	42,0	96,2	92,1	39,5	94,3	93,8	44,3	95,3	94,4
ES I	-	-	0,5	-	-	0,9	-	-	0,4
ES II	43,4	1,4	3,7	45,0	3,2	0,4	42,5	1,1	3,1
AD	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OE	-	-	-	-	-	-	-	0,4	0,1
CND	++	+++	+	+	+++	++	+	+++	-
Nº total de células	698	800	800	711	800	800	785	800	800

- = Ausência; + = frequência rara; ++ = pouco freqüente; +++ = muito freqüente; L-1DAEc = larva um dia após a eclosão; L-20DAEc = larva 20 dias após a eclosão; LI-1DAQ = larva ingurgitada um dia após a queda do hospedeiro; PR = prohemócito; PL = plasmatócito; GR = granulócito; ES = esferulócito; AD = adipohemócito; OE = oenocitóide; CND = células não definidas.

O efeito da temperatura também foi marcante pela queda acentuada no percentual de GR na temperatura de 18°C (Figura 5). Esta característica foi observada por CHU *et al.* (1993) em ostras mantidas em diferentes temperaturas, onde os GR foram mais numerosos na hemolinfa daquelas mantidas em altas temperaturas. CARNEIRO & DAEMON (1996, 1997) relataram a provável função fagocítica destas células neste ixodídeo, entretanto, segundo JOANISSE & STOREY (1994), em baixas temperaturas, ocorre redução da taxa metabólica, e há relatos desta categoria celular estar envolvida no metabolismo intermediário de insetos (ARNOLD, 1974); diante destes fatos, poder-se-ia supor que ocorre atuação destas células no metabolismo deste carrapato, principalmente nas temperaturas mais altas (27 e 32° C), porém esta observação não se repetiu para os estádios subsequentes.

Quanto aos PL, a questão que freqüentemente é levantada, é se estas são células primárias que dão origem a outras formas por transformação secundária, o que é indicado por uma correspondente diminuição de PL e aumento de outros tipos na contagem diferencial de hemócitos, como citado por GUPTA (1979), que especificou como exemplo, o gênero *Prodenia americana*, onde os PL caem em número quando aumenta o número de GR (YEAGER, 1945). Porém estes fatos são confusos para serem corroborados, pois, a hipótese é amplamente variável entre os estádios analisados. Entretanto, analisado independentemente, o estágio de larva se encaixa nas pressuposições acima, pois à temperatura de 32°C somente larvas com 20 dias após a eclosão apresentaram uma pequena concentração deste tipo celular, sendo ausente nas outras fases analisadas e em

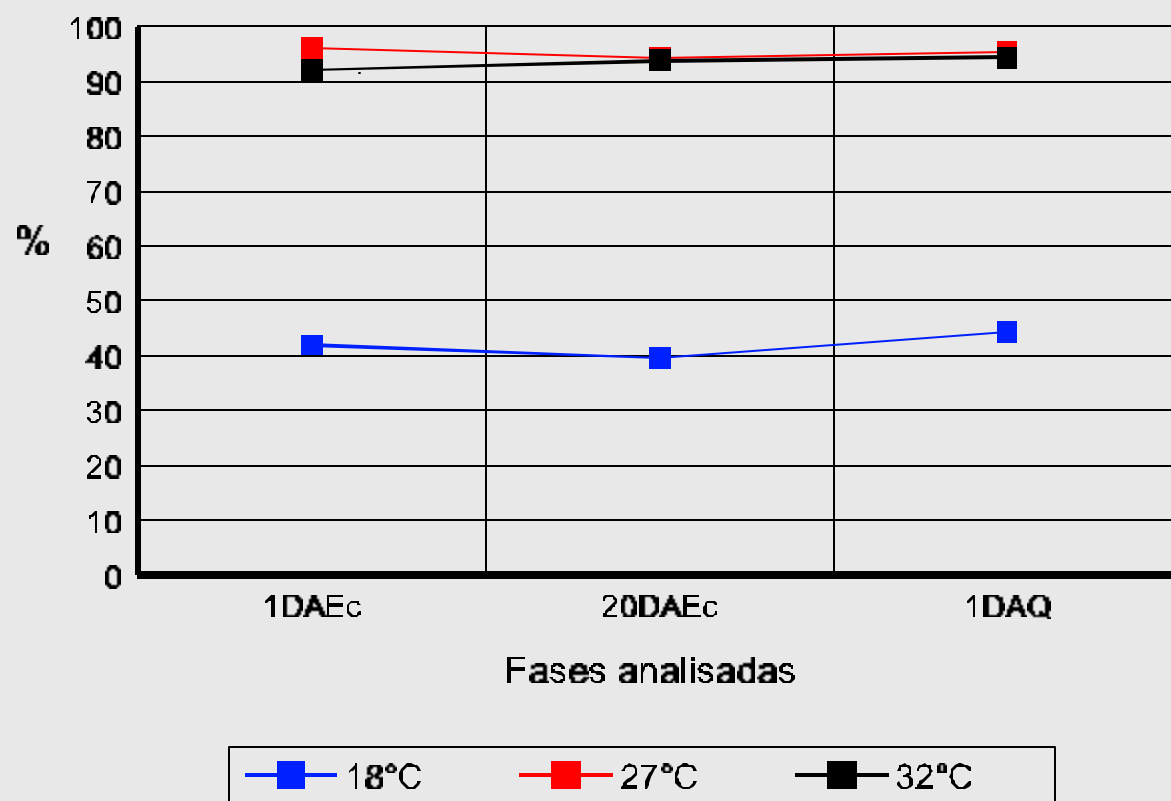


FIGURA 5. Percentual de granulócitos encontrados em larvas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas. 1DAEc = um dia após a eclosão; 20 DAEc = 20 dias após a eclosão; 1DAQ = um dia após a queda do hospedeiro.

todas as fases na temperatura de 27° C, tendo ambas alto número de GR, porém para temperatura de 18°C, este valor foi consideravelmente baixo e foi similar à presença de ES II, tendo esta temperatura presença constante de PL em todas as fases analisadas.

Os PR I foram ausentes para este estágio e os PR II mantiveram-se constantemente em baixo percentual em todas as fases e temperaturas analisadas. De acordo com ARNOLD (1974), os PR parecem ser a célula de origem da qual as principais categorias se diferenciam e ocorrem como uma pequena proporção da população de hemócitos na maioria dos estádios de todos os insetos, o que vem a concordar com o resultado obtido neste trabalho.

Os ES I, ocorreram apenas na temperatura de 32°C e com baixa frequência. Outra divergência marcante ocorreu quanto ao percentual de ES II (Figura 6) observado na temperatura de 18°C. Segundo GUPTA (1979), a função destas células é altamente controversa, mas há relatos de que atuem no processo de respiração dos insetos (HOLLANDE, 1909) e de que possuem alto potencial como vesícula armazenadora de nutrientes (ARNOLD, 1974), o que pode justificar o aumento destas células em temperaturas baixas pelo armazenamento de nutrientes que serão utilizados quando forem, eventualmente, estabelecidas condições adequadas de temperatura, tal como foi aventado para os adipohemócitos.

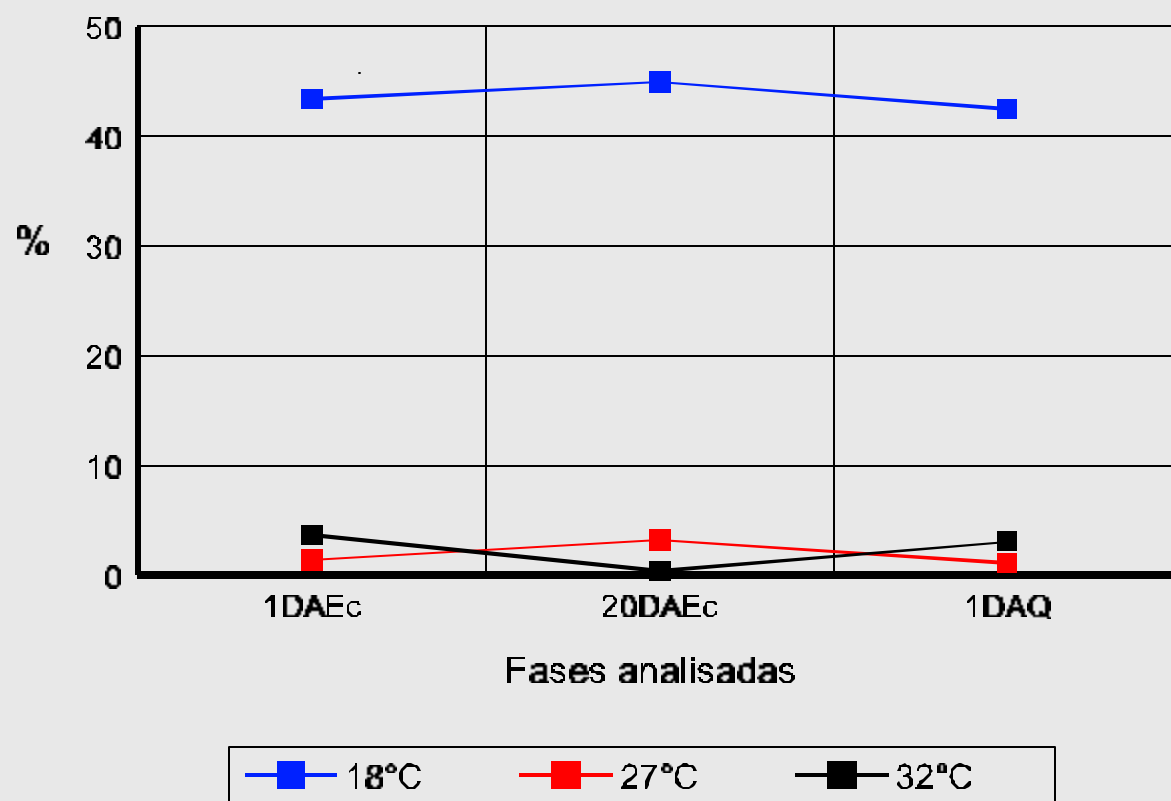


FIGURA 6. Percentual de esferulócitos (ES II) encontrados em larvas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas. 1DAEc = um dia após a eclosão; 20 DAEc = 20 dias após a eclosão; 1DAQ = um dia após a queda do hospedeiro.

Foi constatado também a presença de OE em larvas ingurgitadas logo após a queda do hospedeiro apenas nas temperaturas de 27 e 32°C. Histoquimicamente, os OE, contém tirosinase, proteínas e grânulos PAS-positivos que indicam a presença de glicoproteínas (GUPTA, 1979), o que pode estar associado à função metabólica da hemolinfa após a ingestão de sangue dos vertebrados, sendo o não aparecimento à 18°C devido a alterações provocadas por exposição recente a esta temperatura, embora BALASHOV (1972) afirme que não há evidências da relação entre os OE de ixodídeos com os de insetos.

Quanto aos efeitos da temperatura sobre o ciclo do ixodídeo, NASSAR *et al.* (1971), HEATH (1979), KOCH & TUCK (1986) e BELLATO & DAEMON (1997 a, b) dentre outros, embora utilizando cepas e temperaturas variáveis, citam a influência da temperatura sobre vários parâmetros analisados para este estágio. É relatado que a temperatura constitui-se em um dos maiores fatores de mortalidade para os carrapatos (GLORIA *et al.*, 1993 a) e que a temperatura de 27 e 32°C possibilitam o desenvolvimento de todas as fases do ciclo biológico de *R. sanguineus*. O fato da exposição prolongada deste ixodídeo à temperatura de 18°C não ter permitido que se completasse o ciclo, ou sua atuação negativa sobre os ovos deste, pode ter sido a causa das variações celulares encontradas nesta temperatura, visto que sua biologia é totalmente comprometida à 18°C, alterando assim seu metabolismo e as funções necessárias ao seu desenvolvimento.

4.3. Estádio de ninfa

No estágio de ninfa, como especificado na Tabela 2, os PR I também não foram observados; os PR II foram mais abundantes do que para o estágio de larva e também constantes em todas as fases e temperaturas analisadas, exceto para ninfas ingurgitadas um dia após a queda do hospedeiro, mantidas à temperatura de 18°C, fato este similar ao descrito por GUPTA (1979), que relatou que este tipo celular pode ser numeroso, raro ou ausente na hemolinfa, dependendo do estado de desenvolvimento e fisiológico do inseto no período da observação. O prolongamento do período de muda, como relatado por BELLATO & DAEMON (1997a), pode refletir-se no alto percentual de PR encontrado logo após a ecdise das ninfas.

Na temperatura de 18°C ocorreu presença mais acentuada de AD do que no estágio de larva, porém em baixos percentuais. GUPTA & SUTHERLAND (1966), sugerem que em certas condições tais como, frio, inanição e diapausa reduzem a taxa metabólica o que justificaria a presença de tal célula apenas nesta temperatura.

Neste estágio ocorreu também o aparecimento de PL nas temperaturas de 27 e 32°C. Estes apresentaram uma oscilação variável com pico em ninfas 20 dias após a ecdise (27°C) e ocorrência acentuada nas duas últimas fases analisadas em relação à primeira na temperatura de 32°C. DOLP (1970) e BRINTON & BURGDORFER (1971) citam que o PL foi o tipo celular mais numeroso em ninfas de ixodídeos, sendo este um resultado similar àquele reportado para insetos por YEAGER (1945), mas que

TABELA 2. Número total e percentual de ocorrência dos tipos celulares presentes na hemolinfa de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* em diferentes estádios nutricionais, mantidos em diferentes temperaturas.

Tipo celular	Estádios/Temperatura (°C)								
	N-1DAE			N-20DAE			NI-1DAQ		
	18	27	32	18	27	32	18	27	32
PR I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PR II	9,1	4,0	4,4	3,5	2,5	2,6	-	3,8	4,2
PL	3,4	2,2	0,7	3,4	10,4	4,4	5,0	6,9	3,4
GR	79,8	87,0	90,5	84,9	76,7	89,7	87,0	85,2	88,7
ES I	-	-	-	-	-	-	-	2,7	0,5
ES II	6,7	6,0	4,2	6,6	10,1	3,3	6,1	1,3	3,2
AD	0,6	-	-	0,4	-	-	1,1	-	-
OE	0,4	0,8	0,2	1,2	0,3	-	0,8	0,1	-
CND	-	++	+	+	+++	+	+	+++	+
Nº total de células	754	800	800	682	800	800	721	800	800

- = Ausência; + = frequência rara; ++ = pouco frequente; +++ = muito frequente; N-1DAE = ninfa um dia após a eclosão; N-20DAE = ninfa 20 dias após a eclosão; NI-1DAQ = ninfa ingurgitada um dia após a queda do hospedeiro; PR = prohemócito; PL = plasmatócito; GR = granulócito; ES = esferulócito; AD = adipohemócito; OE = oenocitóide; CND = células não definidas.

contradiz com as observações deste trabalho, no qual fica demonstrado que o GR foi o tipo celular mais freqüente. Esta discrepância pode indicar a existência de variações inter-genéricas e/ou inter-específicas na composição dos tipos celulares da hemolinfa dos ixodídeos.

Também ocorreu a presença constante, porém em baixa quantidade, de OE para as temperaturas de 18 e 27°C, porém estas células só estiveram presentes em ninfas um dia após a ecdise na temperatura de 32°C. De acordo com BRINTON & BURGDORFER (1971), a estrutura morfológica dos OE, sugere uma função primária de síntese de material protéico. Afirma ainda que se os carrapatos são capazes de uma resposta imune, os OE podem ser o tipo celular responsável pela formação de anticorpo; a abundância de grandes mitocôndrias nestas células também indica seu potencial para atividade metabólica, o que, de certa forma, não é corroborado pelo presente trabalho, visto sua ausência na temperatura de 32°C, onde a atividade metabólica é acelerada.

Os ES I foram encontrados apenas na fase de ninfa ingurgitada um dia após a queda nas temperaturas de 27 e 32°C, embora tenha estado presente em todas as fases analisadas para larvas mantidas a 32°C. Portanto, fica claro que este tipo celular está presente somente quando a atividade metabólica do carrapato encontra-se elevada. Esta hipótese, entretanto, entra em choque com o proposto por ARNOLD (1974), que atribui o papel de armazenagem de nutrientes a este tipo celular. Assim, são necessários estudos complementares, abordando aspectos histoquímicos e ultraestruturais, para que a real função desta célula possa ser esclarecida. Este mesmo raciocínio aplica-se ao verificado para ES tipo II, pois embora haja uma tendência a ser encontrado em maior número na temperatura de 18°C, sua presença é constante em todas as temperaturas e fases analisadas.

Neste estágio não foram observadas variações acentuadas nos GR nas temperaturas analisadas (Figura 7), fato este, discrepante quanto à afirmação de CHU *et al.* (1993), de que estas células são mais abundantes em altas temperaturas. Há também diferenças como o encontrado para larvas no presente trabalho, o que poderia indicar que cada estágio de desenvolvimento apresenta um tipo de necessidade metabólica que se expressa nos tipos celulares presentes na hemolinfa; esta presença seria então, em alguns casos, independente da temperatura.

4.4. Adultos

4.4.1. Fêmeas

Todos os tipos celulares foram encontrados neste ínstar, como demonstrado na Tabela 3. Os PR I aparecem na hemolinfa de fêmeas de *R. sanguineus*, em baixas concentrações, nas três temperaturas, sendo ausentes apenas em quenóginas mantidas à 32°C. Já os PR II, foram ausentes em quenóginas mantidas a 18°C e em fêmeas após o ingurgitamento e início da postura na temperatura de 27°C, porém nas três temperaturas atingiu concentração mais elevada que os PR I, sendo também observado que sua maior

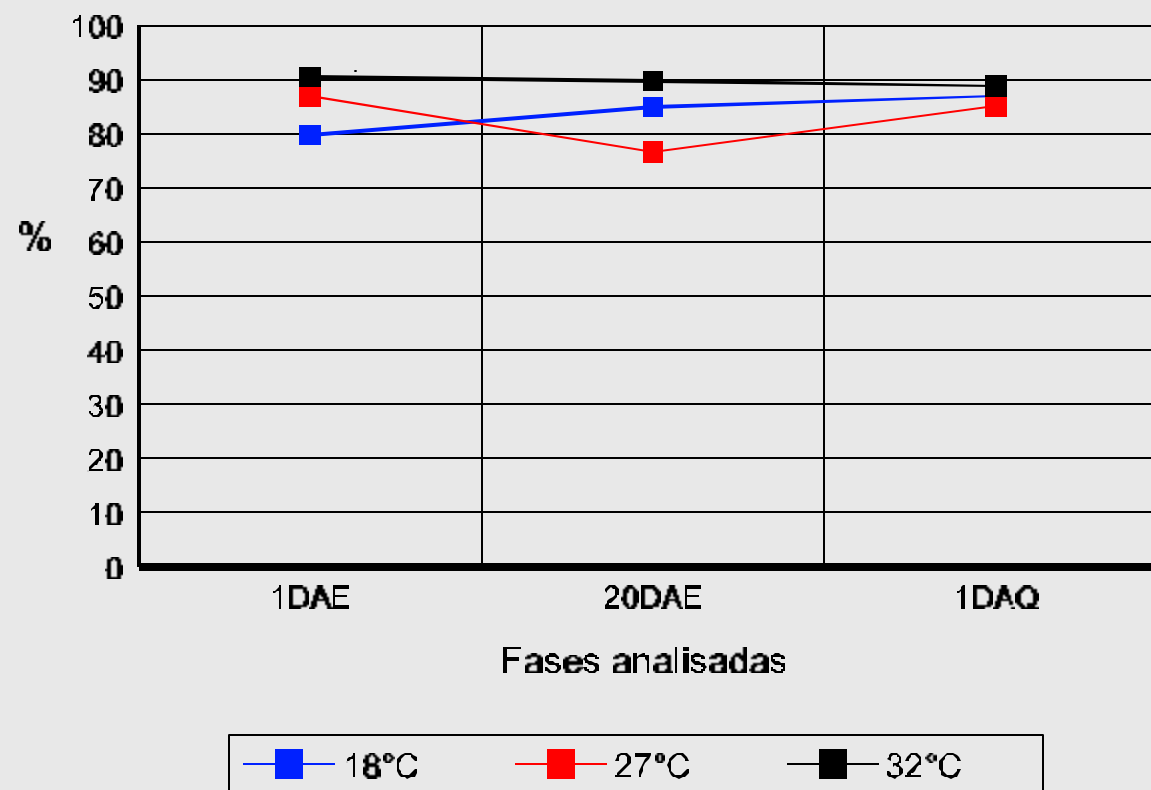


FIGURA 7. Percentual de granulócitos encontrados em ninfas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas. 1DAE = um dia após a ecdise; 20 DAE = 20 dias após a ecdise; 1DAQ = um dia após a queda do hospedeiro.

TABELA 3. Número total e percentual de ocorrência dos tipos celulares presentes na hemolinfa de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* em diferentes estádios nutricionais, mantidos em diferentes temperaturas.

Tipo celular	Estádios/Temperatura (°C)														
	F-1DAE			F-20DAE			FI-1DAQ			FI-7DAP			F-TP		
	18	27	32	18	27	32	18	27	32	18	27	32	18	27	32
PR I	1,5	1,6	0,6	0,4	3,0	2,6	+	2,9	1,0	1,0	0,3	1,1	1,2	0,2	-
PR II	6,8	9,5	3,6	5,3	2,1	3,8	1,0	-	1,7	0,2	-	1,0	-	0,1	0,4
PL	15,0	18,4	10,2	27,5	33,7	46,0	40,6	30,9	34,5	50,8	24,7	15,0	38,7	23,8	65,4
GR	59,4	13,1	35,7	39,0	7,0	1,7	3,7	12,1	13,9	2,5	2,4	7,8	6,3	-	3,2
ES I	1,2	15,3	10,3	1,5	3,8	2,5	-	7,5	2,4	-	3,6	2,5	0,7	7,1	2,9
ES II	15,1	32,6	38,1	25,9	32,9	43,1	50,9	35,2	46,1	44,5	49,6	70,7	52,4	60,6	27,9
AD	1,0	9,5	1,5	0,4	17,5	0,3	3,5	11,4	0,4	1,0	19,4	1,9	0,7	8,2	0,2
OE	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	+	+	-	+	-
CND	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+++
Nº total de células	600	800	800	545	800	800	623	800	800	678	800	800	762	800	800

- = Ausência; + = frequência rara; ++ = pouco freqüente; +++ = muito freqüente; F-1DAE = fêmea um dia após a eclosão; F-20DAE = fêmea 20 dias após a eclosão; FI-1DAQ = fêmea ingurgitada um dia após a queda do hospedeiro; FI-7DAP = fêmea ingurgitada sete dias após iniciar postura; F-TP = fêmea ingurgitada ao término da postura; PR = prohemócito; PL = plasmatócito; GR = granulócito; ES = esferulócito; AD = adipohemócito; OE = oenocitóide; CND = células não definidas.

freqüência se deu logo após a realização da ecdise e foi decrescendo com o desenvolvimento deste ínstar. Este fato contrasta com a observação de DOLP (1970) para adultos dos gêneros *Argas* e *Hyalomma* para os quais ela afirma que a proporção de PR foi substancialmente mais elevada do que a reportada para insetos. Porém é correlato ao fato de que maiores concentrações estão associadas com adultos não ingurgitados, ocorrendo um decréscimo com o ingurgitamento mas, entretanto, este decréscimo não foi correlacionado a um aumento dos outros tipos celulares encontrados.

Os tipos celulares mais frequentes foram PL, GR e ES II, variando de fase a fase de acordo com a temperatura empregada. Como pode ser observado na Figura 8, os PL aumentaram com o desenvolvimento do ixodídeo, apresentando uma ligeira queda em quenóginas na temperatura de 18° C; já à 27 e 32°C, este tipo celular aumentou com a idade do ixodídeo, decrescendo em percentual com o ingurgitamento, sendo que a 32°C, diferenciou-se pela ocorrência de um aumento brusco e acentuado em quenóginas.

Na Figura 9 é demonstrada a variação dos GR. Estes, diminuíram consideravelmente com o ingurgitamento e se mantiveram em baixos percentuais na temperatura de 18° C; à 27° C, entretanto, foi observado diminuição deste tipo celular com o tempo de vida do carrapato, ocorrendo aumento em número com o ingurgitamento seguido de novo decréscimo com o desenvolvimento, até desaparecerem; e à 32° C, os GR acompanharam o mesmo desenvolvimento citado para a temperatura de 27°C, porém, se mantiveram presentes em quenóginas em baixo percentual.

Quanto aos ES II (Figura 10), à 18°C, estas células aumentaram em número com o ingurgitamento e se mantiveram em alto percentual após este; à 27 e 32°C aumentaram com o desenvolvimento do ixodídeo, sendo que à 32°C ocorreu uma queda acentuada em quenóginas.

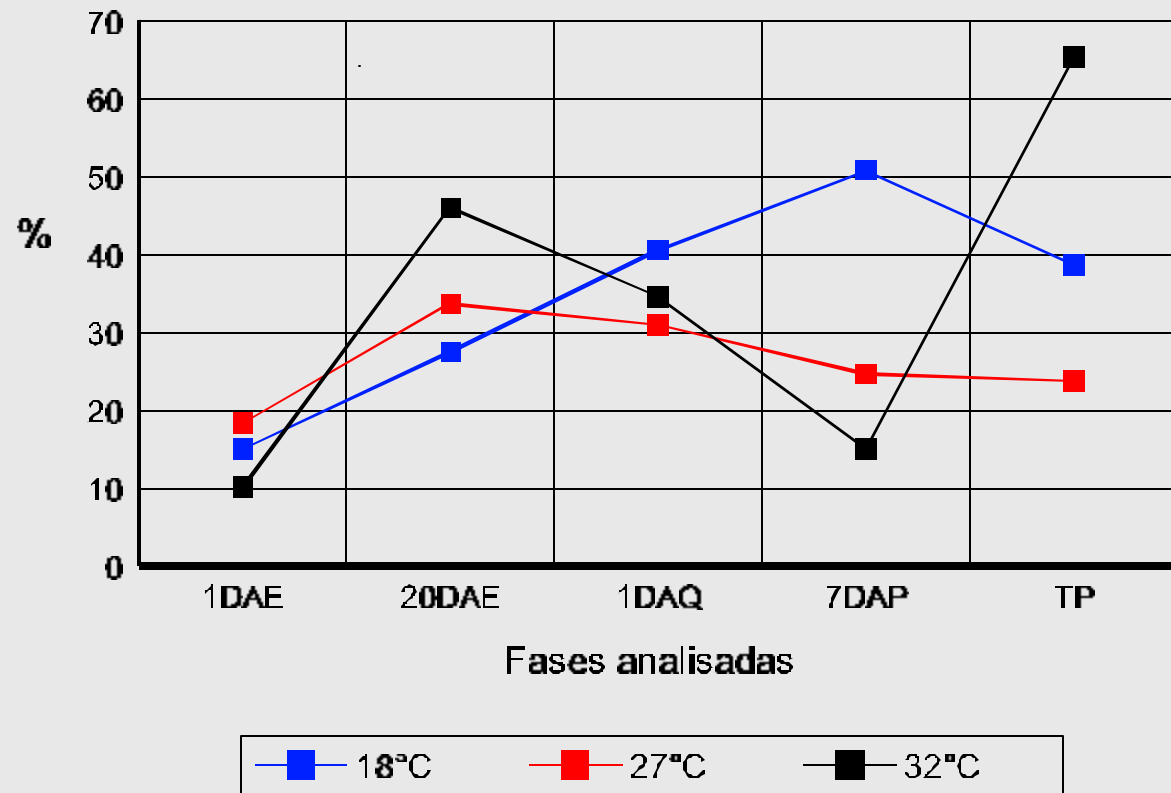


FIGURA 8. Percentual de plasmatócitos encontrados em fêmeas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas. 1DAE = um dia após a ecdise; 20 DAE = 20 dias após a ecdise; 1DAQ = um dia após a queda do hospedeiro; 7DAP = sete dias após iniciar postura; TP = término da postura.

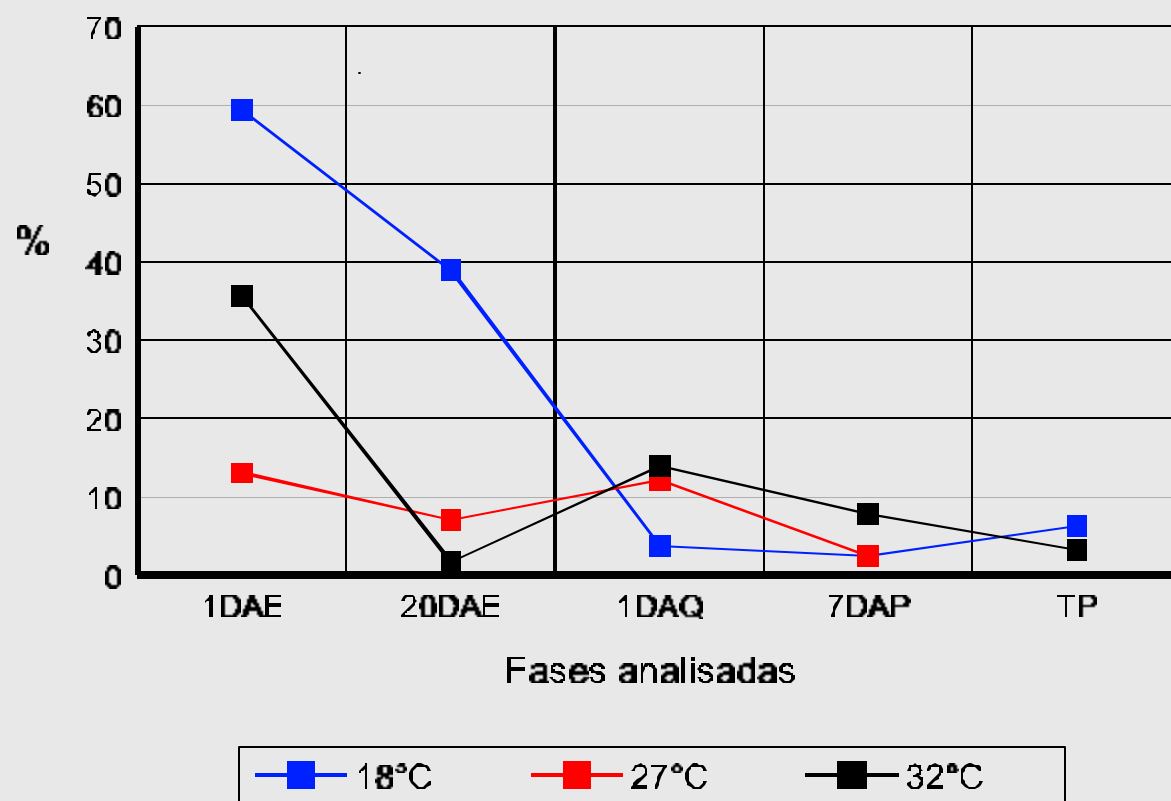


FIGURA 9. Percentual de granulócitos encontrados em fêmeas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas. 1DAE = um dia após a ecdise; 20 DAE = 20 dias após a ecdise; 1DAQ = um dia após a queda do hospedeiro; 7DAP = sete dias após iniciar postura; TP = término da postura.

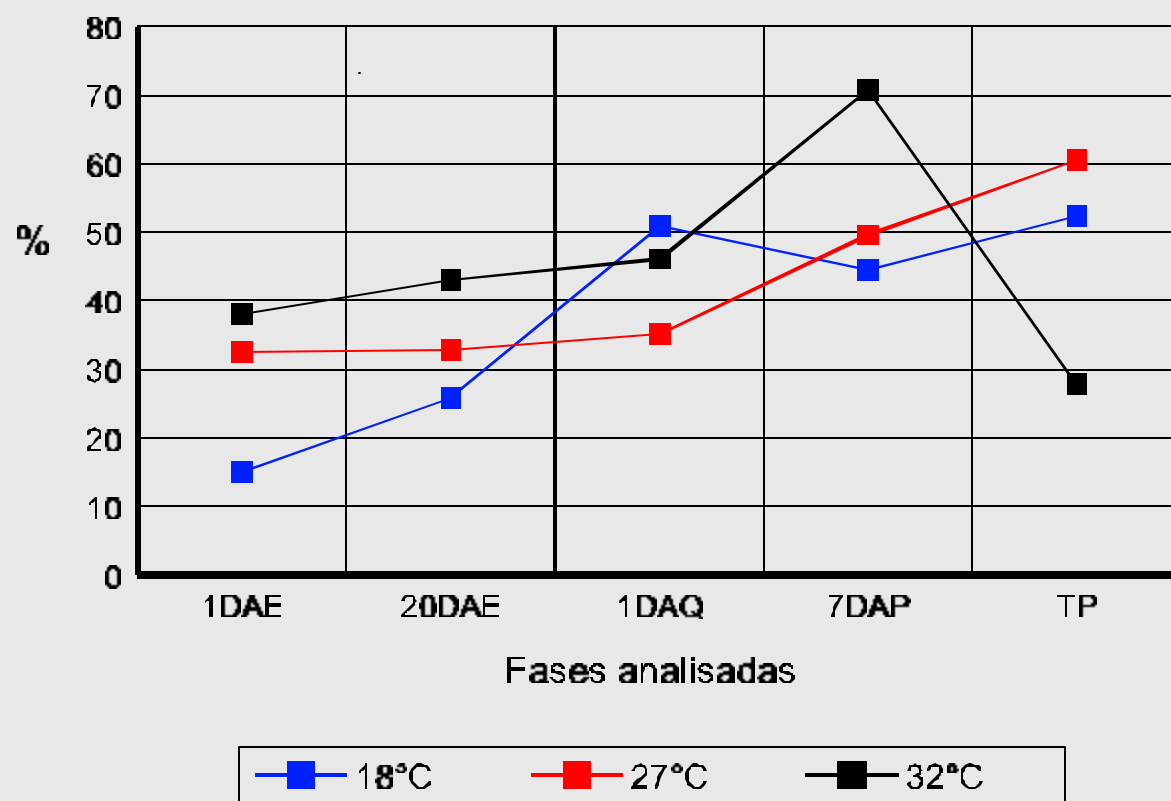


FIGURA 10. Percentual de esferulócitos (ES II) encontrados em fêmeas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas. 1DAE = um dia após a ecdise; 20 DAE = 20 dias após a ecdise; 1DAQ = um dia após a queda do hospedeiro; 7DAP = sete dias após iniciar postura; TP = término da postura.

Há indícios na literatura, de que os PL, GR e ES sejam células que atuem na defesa, metabolismo e reserva de nutrientes respectivamente (BOMAN & HULTMARK, 1987; ARNOLD, 1974; GUPTA, 1979); sendo assim, a menor concentração de GR nas temperaturas de 27 e 32°C, pode estar associada à participação destas células no metabolismo do ixodídeo, em contrapartida sua diminuição e aumento de ES na temperatura de 18°C após o ingurgitamento, pode novamente expressar a queda do metabolismo nesta temperatura associada à reserva de nutrientes, como hipotetizado por ARNOLD (1974).

Os ES I foram pouco observados ou ausentes na temperatura de 18°C, havendo acentuado aumento nas temperaturas de 27 e 32°C principalmente logo após a ecdise. A variação morfológica e de coloração destas células, de acordo com BRINTON & BURGDORFER (1971), parece ocorrer devido a mudanças na composição química das esférulas como evidenciado por alterações em suas propriedades corantes no presente trabalho. A coloração cinza claro (Figura 1h) pode indicar a presença de glico ou mucoproteínas e a coloração densa e escura (Figura 1i) pode sugerir uma conversão dessas para lipoproteínas, substâncias essas utilizadas no metabolismo ativo presente nas temperaturas de 27 e 32°C.

Os AD, embora presentes em todas as fases observadas, nas três temperaturas analisadas, tiveram sua maior concentração na temperatura de 27°C (Figura 11), sendo considerado nesta temperatura como um dos tipos celulares mais abundantes para este estágio. Este fato pode estar relacionado à maior utilização destas células quando o metabolismo é acelerado (32°C) ou quando é retardado (18°C). Porém, nada há na literatura consultada que possa justificar essa observação.

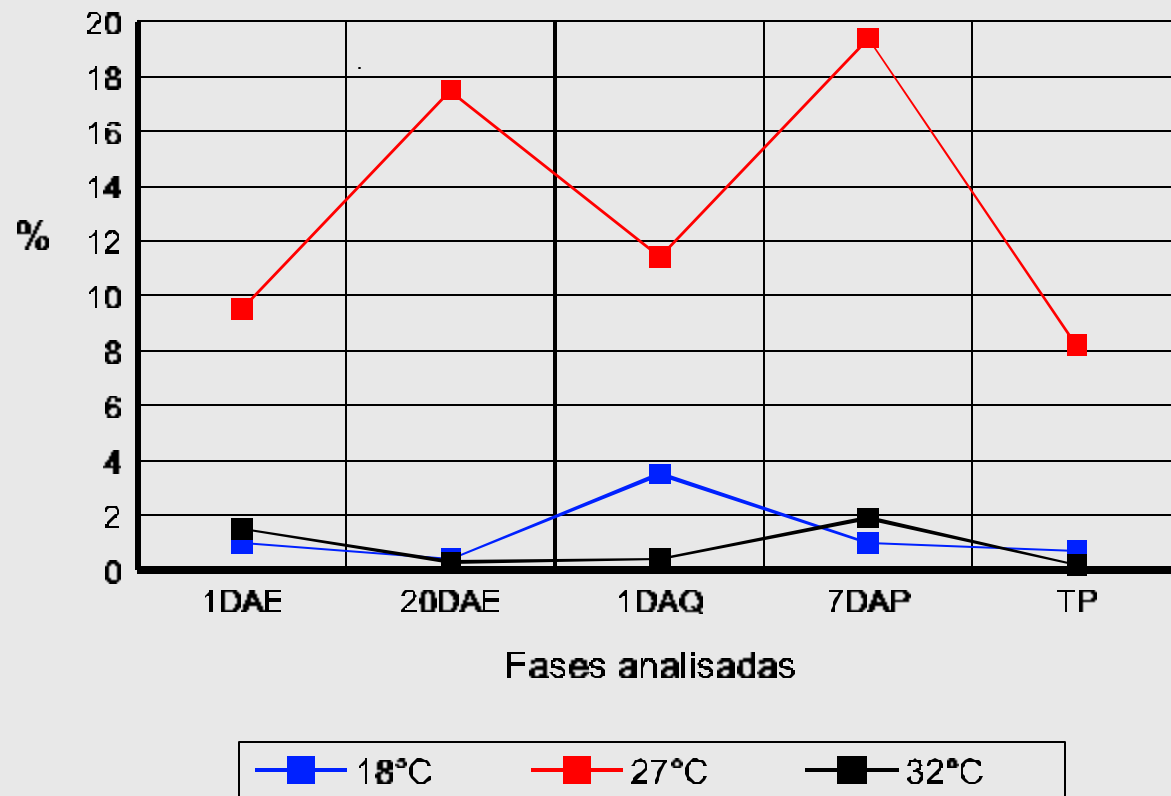


FIGURA 11. Percentual de adipohemócitos encontrados em fêmeas mantidas em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas. 1DAE = um dia após a ecdise; 20 DAE = 20 dias após a ecdise; 1DAQ = um dia após a queda do hospedeiro; 7DAP = sete dias após iniciar postura; TP = término da postura.

Quanto aos OE, eles se mantiveram sempre escassos ou ausentes na hemolinfa, o que segundo BALASHOV (1972) pode ser devido à aderência destas células no corpo gorduroso, contudo, estas células foram mais observadas em fêmeas logo após o ingurgitamento, na temperatura de 18°C. Se ocorre realmente uma participação ativa deste tipo celular no metabolismo dos carrapatos, como sugerido por BRINTON & BURGDORFER (1971), esse efeito não foi análogo aos resultados do presente trabalho.

Segundo BELLATO & DAEMON (1997a) a ação da temperatura sobre os ínstares, possui maior reflexo no estágio adulto, o que vem a ser corroborado pelas presentes observações onde a fisiologia e o metabolismo foram alterados conforme a temperatura. Também está de acordo com CARNEIRO & DAEMON (1996), onde citam que o aspecto qualitativo dos hemócitos descritos em cada estágio analisado evidenciou maior variabilidade dos tipos celulares com o avanço do desenvolvimento do ixodídeo.

4.4.2. Machos

De acordo com os dados expostos na Tabela 4 pode-se verificar que a ausência de PR I foi observada apenas na temperatura de 32°C para machos um dia após a ecdise. O percentual deste tipo celular também foi baixo como ocorrido nas fêmeas e os PR II mantiveram também maior ocorrência logo após a ecdise, sugerindo algum tipo de associação deste tipo celular ao processo de ecdise.

TABELA 4. Número total e percentual de ocorrência dos tipos celulares presentes na hemolinfa de machos de *Rhipicephalus sanguineus* em diferentes estádios nutricionais, mantidos em diferentes temperaturas.

Tipo celular	Estádios/Temperatura (°C)											
	M-1DAE			M-20DAE			M-1DAR			M-20DAR		
	18	27	32	18	27	32	18	27	32	18	27	32
PR I	0,3	3,2	-	3,3	1,8	0,6	2,5	2,7	0,4	2,2	0,3	2,0
PR II	2,6	1,9	4,6	1,3	0,1	1,1	2,2	+	0,9	0,9	0,5	0,3
PL	3,3	21,1	26,4	41,6	11,1	46,7	68,2	33,7	52,4	54,5	24,5	63,8
GR	79,9	29,3	24,1	26,1	35,3	10,9	12,8	6,4	13,4	26,5	1,8	7,3
ES I	1,7	8,2	5,2	0,1	12,3	9,3	-	16,4	0,9	-	6,7	1,7
ES II	11,5	26,2	34,1	27,3	32,1	30,9	13,4	25,2	32,0	14,6	60,9	24,9
AD	0,5	10,1	0,4	0,3	7,3	0,4	0,7	15,6	-	1,2	5,3	-
OE	0,2	-	5,2	-	-	0,1	0,2	-	-	0,1	-	-
CND	+	+	++	+++	+	+	+	+	+	+	+	++
Nº total de células	800	800	800	697	800	800	714	800	800	739	800	800

- = Ausência; + = frequência rara; ++ = pouco frequente; +++ = muito frequente; M-1DAE = macho um dia após a eclosão; M-20DAE = macho 20 dias após a eclosão; M-1DAR = macho um dia após a retirada do hospedeiro; M-20DAR = macho 20 dias após a retirada do hospedeiro; PR = prohemócito; PL = plasmatócito; GR = granulócito; ES = esferulócito; AD = adipohemócito; OE = oenocitóide; CND = células não definidas.

Para os PL, foram constatadas duas tendências distintas (Figura 12): nas temperaturas extremas seu número elevou-se conforme a fase analisada, enquanto a 27°C houve dois picos de ocorrência, em machos um dia após a ecdise e um dia após a sua retirada do hospedeiro. Segundo BOMAN & HULTMARK (1987), os PL estão envolvidos em processos imunológicos de defesa, o que eventualmente poderia explicar seu número elevado em situações extremas de temperatura. Do mesmo modo os dois picos observados à 27°C poderiam refletir processos de defesa frente a eventuais “resíduos” do processo de ecdise e de elementos agressores provenientes do contato do hospedeiro.

Ao contrário do especificado para os PL, percebe-se uma tendência à queda do número de GR (Figura 13) conforme avança o desenvolvimento neste estágio, à exceção de uma pequena elevação na temperatura de 27°C em machos 20 dias após a ecdise. Segundo GUPTA (1979), este tipo celular teria participação nos processos metabólicos dos artrópodes, sem, entretanto, definir claramente a extensão de suas exatas funções. Os resultados do presente trabalho não permitem corroborar ou negar esta hipótese, ficando claro mais uma vez a necessidade de estudos mais aprofundados sobre as funções dos hemócitos de carrapatos.

Os ES sempre estiveram em menor número ou mesmo ausentes na temperatura de 18°C, independente da fase analisada (Figura 14), e como já citado anteriormente estas células tem por função o armazenamento de nutrientes (ARNOLD, 1974), fato este que o resultado do presente trabalho parece refutar para este estágio, visto que seu número foi maior nas temperaturas com maior atividade metabólica.

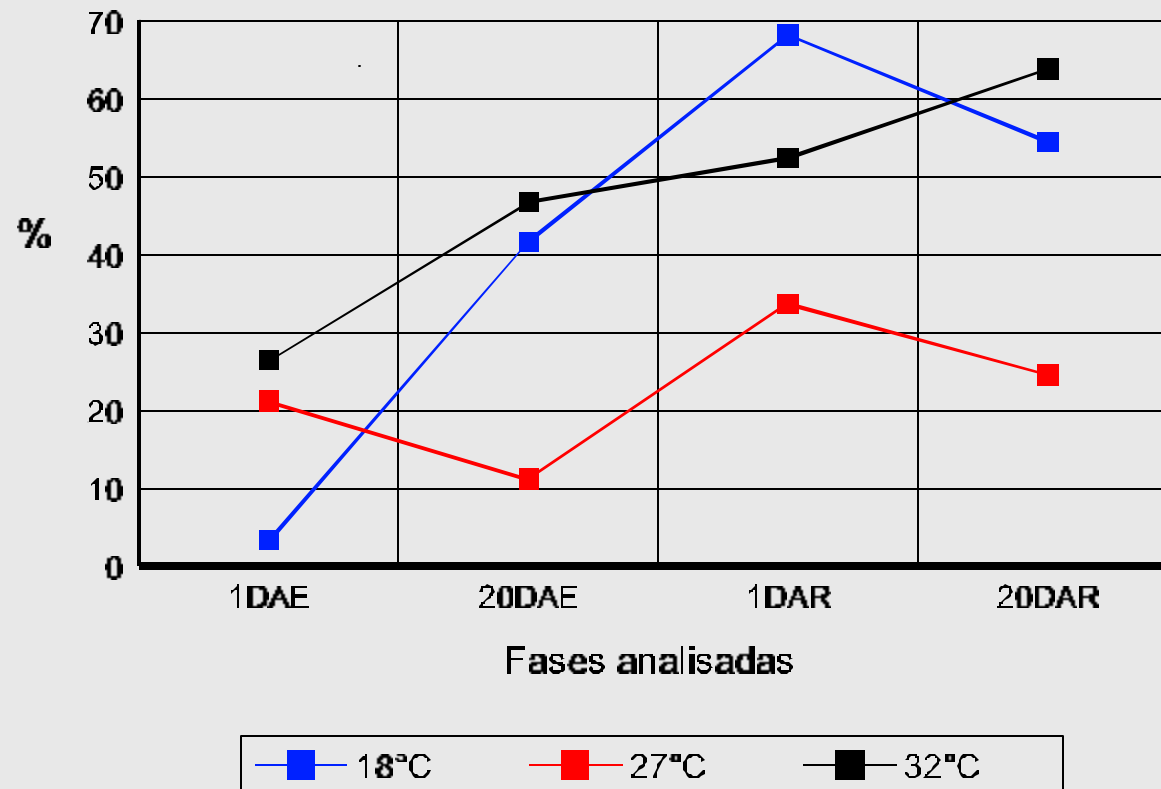


FIGURA 12. Percentual de plasmatócitos encontrados em machos mantidos em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas. 1DAE = um dia após a ecdise; 20 DAE = 20 dias após a ecdise; 1DAR = um dia após a retirada do hospedeiro; 20DAR = vinte dias após a retirada do hospedeiro.

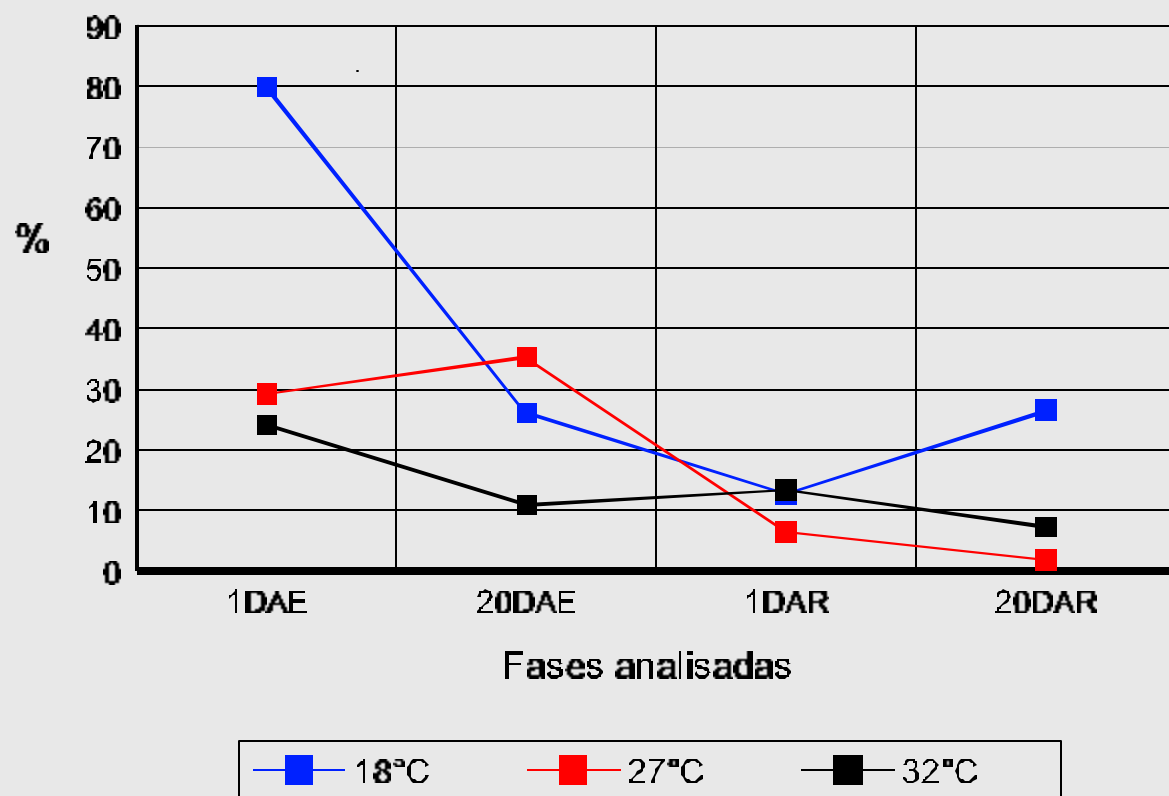


FIGURA 13. Percentual de granulócitos encontrados em machos mantidos em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas. 1DAE = um dia após a ecdise; 20 DAE = 20 dias após a ecdise; 1DAR = um dia após a retirada do hospedeiro; 20DAR = vinte dias após a retirada do hospedeiro.

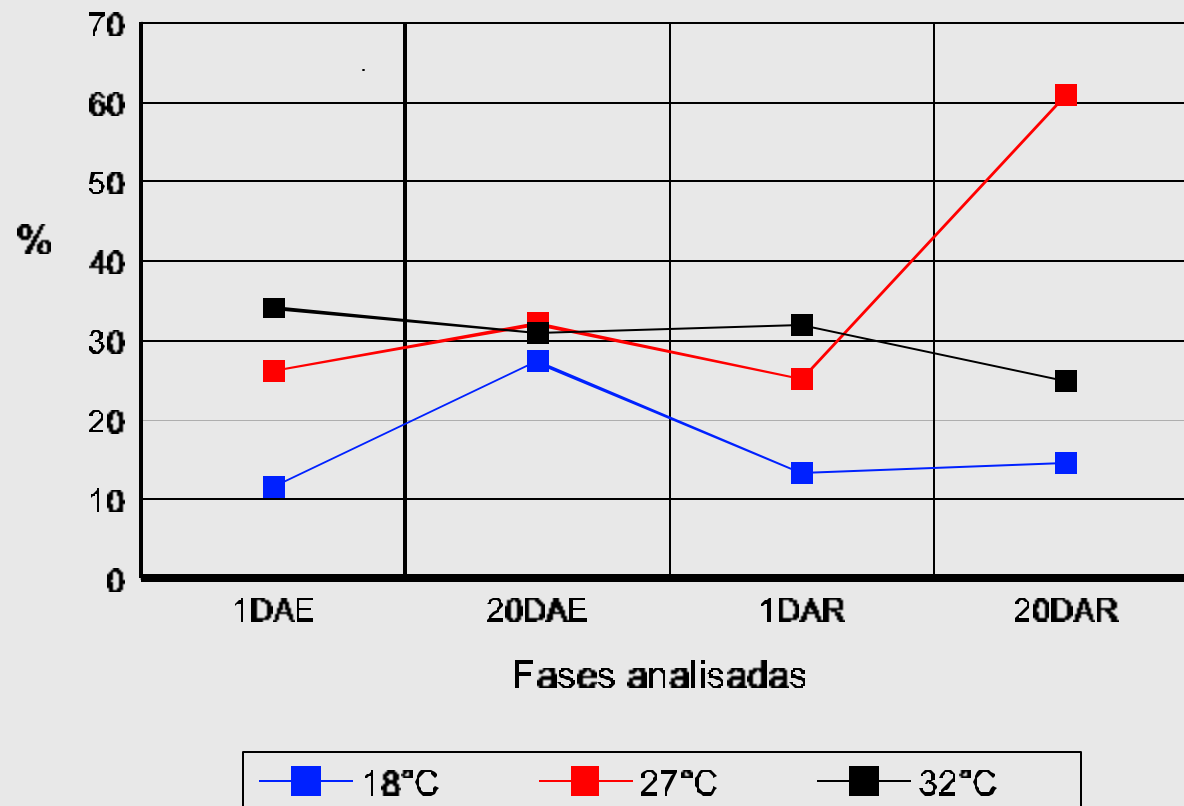


FIGURA 14. Percentual de esferulócitos (ES II) encontrados em machos mantidos em três temperaturas (18, 27 e 32°C) em diferentes fases analisadas. 1DAE = um dia após a ecdise; 20 DAE = 20 dias após a ecdise; 1DAR = um dia após a retirada do hospedeiro; 20DAR = vinte dias após a retirada do hospedeiro.

Os AD tiveram também maior concentração na temperatura de 27°C, tal como verificado em fêmeas. É interessante notar que no estágio adulto a presença de AD foi inversa ao observado para larvas e ninfas, nas quais constatou-se sua presença somente na temperatura 18°C. Assim, mais uma vez, fica patente que a composição relativa dos tipos hemocitários varia de estágio para estágio, por vezes sem influência perceptível da temperatura.

Os OE foram ausentes para machos de *R. sanguineus* mantidos à temperatura de 27°C, sendo observado em baixa frequência nos machos antes do contato com o hospedeiro na temperatura de 32°C e ausentes apenas em machos 20 dias após a ecdise na temperatura de 18°C.

A efetiva atuação dos tipos celulares descritos no metabolismo deste ínstar segue o mesmo raciocínio do descrito para fêmeas deste ixodídeo. DOLP (1970) não observou diferenças entre as categorias de hemócitos com relação ao sexo, mas em CARNEIRO & DAEMON (1997) e no presente trabalho a variação existente entre as fases analisadas e os tipos celulares encontrados, evidencia que existe uma variabilidade, provavelmente em função das diferenças entre as exigências metabólicas de machos e fêmeas.

4.5. Considerações finais

A Tabela 5 engloba as alterações no percentual de ocorrência dos tipos celulares por estágio analisado para prover uma visão mais clara das diferenças abordadas para cada estado de desenvolvimento.

TABELA 5. Percentual de ocorrência dos tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas, ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* em diferentes estádios nutricionais, mantidos em diferentes temperaturas.

Tipo celular	Estádios/Temperatura (°C)											
	Larvas			Ninfas			Fêmeas			Machos		
	18	27	32	18	27	32	18	27	32	18	27	32
PR I	-	-	-	-	-	-	0,8	1,6	1,1	2,1	2,0	0,7
PR II	2,8	2,7	2,6	4,2	3,4	3,7	2,7	2,3	2,1	1,7	0,6	1,6
PL	11,6	-	1,0	3,9	6,5	2,8	34,5	26,3	34,2	41,9	23,1	47,3
GR	41,9	95,3	93,4	83,6	83,0	89,5	22,2	7,0	12,5	36,4	18,2	13,9
ES I	-	-	0,6	-	0,9	0,2	0,7	7,5	4,1	0,4	10,9	4,3
ES II	43,7	1,9	2,3	6,4	5,8	3,7	37,7	42,1	45,1	16,7	37,5	30,5
AD	+	-	-	0,7	-	-	1,3	13,2	0,9	0,7	7,7	0,4
OE	-	0,1	0,1	1,2	0,4	0,1	0,1	+	+	0,1	-	1,3

- = Ausência; + = frequência rara; PR = prohemócito; PL = plasmatócito; GR = granulócito; ES = esferulócito; AD = adipohemócito; OE = oenocitóide.

As diferenças na ocorrência dos tipos celulares nas três temperaturas empregadas evidência que ocorrem diferenças no metabolismo de cada estágio do ixodídeo, sendo que nos adultos, devido a função reprodutiva, ocorre maior exigência metabólica e maior consumo de nutrientes. No presente trabalho, os tipos celulares mais frequentes variaram de acordo com o estágio analisado, como descrito a seguir:

- Larvas (18°C) - GR e ES
- Larvas (27 e 32°C) e Ninfas (18, 27 e 32°C) - GR
- Fêmeas (18 e 32°C) - PL, GR e ES
- Fêmeas (27°C) - PL, ES e AD
- Machos (18°C) - PL, GR e ES
- Machos (27 e 32°C) - ES, PL e GR

Conforme ressaltado anteriormente, investigações mais aprofundadas recorrendo a técnicas de histoquímica, imunocitoquímica e de ultraestrutura, certamente contribuirão para elucidar as complexas interações entre os hemócitos e a atividade metabólica dos carrapatos. Esta maior compreensão poderá eventualmente levar ao desenvolvimento de técnicas de bloqueio seletivo de tipos celulares vitais para o prosseguimento do ciclo biológico de um determinado ixodídeo, provendo assim, novos métodos de controle desta importante praga de animais domésticos e silvestres.

5. CONCLUSÕES

1. Foram caracterizados os seguintes tipos celulares: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides, sendo os PL, GR e ES os mais abundantes na hemolinfa de *Rhipicephalus sanguineus*.

2. Os PR podem estar associados com o processo de ecdise deste ixodídeo.

3. A variabilidade encontrada entre os tipos celulares presentes na hemolinfa de machos e fêmeas, provavelmente ocorre em função das diferenças entre as exigências metabólicas destes ínstares.

4. O estado fisiológico do ixodídeo influencia a presença ou ausência dos tipos celulares na hemolinfa de acordo com suas necessidades metabólicas.

5. Ocorre maior variabilidade dos tipos celulares conforme avança o desenvolvimento do ixodídeo.

6. As variações encontradas dentro e entre cada estágio analisado expressam uma interação entre as diferentes temperaturas e as necessidades metabólicas inerentes àqueles estádios.

7. As variações encontradas entre o número e tipo celular presente em cada fase e estágio analisados não permitem concluir que estas estejam associadas unicamente à temperatura empregada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMOSOVA, L.I. 1983. Ultrastructural characters of haemocytes of the ixodid tick *Hyalomma asiaticum* (Ixodidae). **Parazitologiya**, 17:126-133.
- ARNOLD, J.W. 1974. The hemocytes of insects. *In*: M. ROCKSTEIN (ed.). **The Physiology of Insecta**. Vol. V, New York, Academic press, p. 201-254.
- AZAMBUJA, P., E.S. GARCIA & N.A. RATCLIFFE. 1991. Aspectos of classification of hemiptera hemocytes from six triatomine species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 86:1-10.
- BAIDU, Y.N. 1987. *Rhipicephalus simpsoni* (Acari: Ixodidae) development under controlled conditions. **J. Med. Entomol**, 24:438-443.

- BALASHOV, Y.S. 1972. **Bloodsucking Ticks (Ixodoidea) - Vectors of Diseases in Man and Animals**. Transl. 500 (T500). Med. Zool. Dep. USNAMRU, nº 3. Cairo, Egypty, U.A.R. 319 p.
- BASTOS, K.M.S., E. DAEMON, J.L.H. FACCINI & D.W. DA CUNHA. 1996. Efeitos de diferentes temperaturas sobre a fase não parasitária de *Dermacentor (anocentor) nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 5(1):29-32.
- BELLATO, V. 1995. **Efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em condições de laboratório**. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Rio de Janeiro, 59 p.
- BELLATO, V. & D. DAEMON. 1997a. Efeitos de três temperaturas sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 6(1):21-27.
- BELLATO, V. & D. DAEMON. 1997b. Influência da temperatura de manutenção da fase não parasitária sobre a fase parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 6(1):15-19.

- BIRD, R.G., N. KORDOVÁ & J. REHÁČEK. 1967. Fine structure of *Rickettsia prowazeki* in the haemocytes of ticks *Hyalloma dromedarii*. **Acta Virol.**, **11**:60-62.
- BOOMAN, H.G. & D. HULTMARK. 1987. Cell-Free immunity in insects. **Ann. Rev. Microbiol.**, **41**:103-126.
- BRANAGAN, D. 1973. The developmental periods of the Ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neum. under laboratory conditions. **Bull. Ent. Res.**, **63**:155-168.
- BRINTON, L.P. & W. BURGDORFER. 1971. Fine structure of normal hemocytes in *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae). **J. Parasitol.**, **57**:1110-1127.
- CARNEIRO, M.E. 1995. **Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas, ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Ixodoidea: Ixodidae) em diferentes estados nutricionais.** Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Rio de Janeiro, 84 p.
- CARNEIRO, M.E. & E. DAEMON. 1996. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus*

- (Latreille) (Ixodoidea, Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. **Revta. Bras. Zool.**, **13**(3):609-620.
- CARNEIRO, M.E. & E. DAEMON. 1997. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Ixodoidea: Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, **6**(1):1-9.
- CHEN, J.C., M.N. LIN, Y.Y. TING & J.N. LIN. 1995. Survival, haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinity and temperature levels. **Comp. Biochem. Physiol.**, **110**(3):253-258.
- CHIHRAANE, J. & G. LAUGÉ. 1994. Incidences de chocs de températures élevées sur la lignée germinale mâle de *Trichogramma brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae). **Entomophaga**, **39**(1):11-20.
- CHU, F.L.E., J.F. LA-PEYRE & J.F. PEYRE. 1993. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: temperature effects. **Dis. Aquatic Org.**, **16**(3):223-234.

- CORY, J. & C.E. YUNKER. 1971. Primary cultures of tick hemocytes as systems for arbovirus growth. **Ann. Ent. Soc. Amer.**, **64**:1249- 1254.
- CROSSLEY, A.C. 1975. The cytophysiology of insect blood. **Adv. Insect Physiol.**, **11**:117-222.
- DALGLIESH, R.J. & N.P. STEWART. 1982. Some effects of time, temperature and feeding on infection rates with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus* Larvae. **Int. J. Parasitol.**, **12**(4):323-326.
- DANNHORN, D.R. & K.A. SEITZ. 1987. Hemocytes of *Leiobunum limbatum* and two other species of harvestmen (Aracnida, Opiliones): Morphological classification and functional aspects. **J. Morph.**, **193**:185-196.
- DESPINS, J.L. 1992. Effects of temperature and humidity on ovipositional biology and egg development of the tropical horse tick, *Dermacentor (Anocentor) nitens*. **J. Med. Entomol.**, **29**(2):332-337.
- DÍAZ, G., R. DE LA VEJA & G. CHÁVEZ. 1991. Influencia de la temperatura e la humedad relativa en la fase no parasitaria de *Anocentor nitens* (Ixodoidea: Ixodidae). **Rev. Salud Anim.**, **13**:124-132.

- DOLP, R.M. 1970. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Qualitative and quantitative studies of hemocysts. **J. Med. Ent.**, **7**:277-288.
- DOUGLAS, J.R. 1943. The internal anatomy of *Dermacentor andersoni* Stiles. **Univ. Calif. Publ. Entomol.**, **7**:207-272.
- DUMAN, J.G., D.W. WU, P.K. WOLBER, G.M. MUELLER & L.G. NEVEN. 1991. Further characterization of the lipoprotein ice nucleator from freeze tolerant larvae of the crane fly *Tipula trivittata*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **99**(3):599- 607.
- DUNN, P.E. 1986. Biochemical aspects of insect immunology. **Ann. Rev. Entomol.**, **31**:321-339.
- EAST, J. & N. HILLEN. 1980. Haemocytes of *Glossina*. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, **74**:471-474.

- EGGENBERGER, L.R., W.J. LAMOREAUX & L.S. COONS. 1990. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. **Exp. Appl. Acarol.**, **9**:279-287.
- EHLER, W.J., W. ESPIG & K.H. HOFFMAN. 1986. Blood volume of female adult crickets, *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera) - methods and the influence of temperature and reproductive activity. **Comp. Biochem. Physiol.**, **83**(4):731-734.
- EL SHOURA, S.M. 1986. Fine structure of the hemocytes and nephrocytes of *Argas (Persicargas) arboreus* (Ixodoidea: Argasidae). **J. Morph.**, **189**:17-24.
- EL SHOURA, S.M. 1989. Ultrastructure of the larval haemocytes and nephrocytes in the tick *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* (Ixodoidea: Argasidae). **J. Acarologia**, **30**:35-40.
- ESHKY, A.A., A.C. TAYLOR & R.J.A. ATKINSON. 1996. The effects of temperature on aspects of respiratory physiology of the semi-terrestrial Crabs, *Uca inversa* (Hoffmann) and *Metopograpsus messor* (Forsk.) from the Red Sea. **Comp. Biochem. Physiol.**, **114**(4):297-304.

- FISHER, R.C. & V.K. GANESALINGAM. 1970. Changes in the compositions of host haemolymph after attack by an insect parasitoid. **The Invertebrates**, 3(259):191-192.
- FISHER, W.S., M. AUFFRET & G. BALOUET. 1987. Response of european flat oyster (*Ostrea edulis*) hemocytes to acute salinity and temperature changes. **Aquaculture**, 67:179-190.
- GEHRKEN, U. & T.E. SOUTHON. 1997. Effect of temperature on cold-hardiness and tissue ice formation in the adult Chrysomelid beetle *Melasma collaris* L.. **J. Insect Physiol.**, 43(6):587-593.
- GIANNOTTI, E. & F.H. CAETANO. 1985. A comparative study of the hemocytes of *Atta laevigata* adults (Formicidae: Myrmicinae). **Rev. Brasil. Genet.**, 8:37-45.
- GIANNOTTI, E. & F.H. CAETANO. 1990. Caracterização morfológica dos hemócitos de *Polistes lanio lanio* (Hymenoptera, Vespidae) durante o desenvolvimento pós-embrionário. **Rev. Brasil. Biol.**, 51:179-184.

- GLÓRIA, M.A., E. DAEMON, J.L.H. FACCINI & L. GRISI. 1993a. Influência de diferentes temperaturas sobre a biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (Can., 1887) (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 2(2):85-91.
- GLÓRIA, M.A., J.L.H. FACCINI, E. DAEMON & L. GRISI. 1993b. Biologia comparativa da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (Can., 1887) resistente e sensível a carrapaticidas em condições de laboratório. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 2(2):79-84.
- GODDARD, J. 1989. Focus of human parasitism by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, 26(6):628-629.
- GUGLIELMONE, A.A. 1992. The effect of temperature and humidity on development and longevity of *Amblyomma triguttatum triguttatum* (Acarina: Ixodidae). **Bull. Entomol. Res.**, 82:203-208.
- GUPTA, A.P. & D.J. SUTHERLAND. 1966. In vitro transformations of the insect plasmatocyte in some insects. **J. Insect Physiol.**, 12:1369-1375.

- GUPTA, A.P. 1979. Hemocyte types: their structure, synonymies, interrelationships and taxonomic significance. *In*: GUPTA, A.P. (ed.). **Insect Hemocytes**. Cambridge, Cambridge University Press, p. 85-127.
- HAAL, D.W. 1983. Mosquito hemocyte. **A Review. Dev. Comp. Immunol.**, 7:1- 12.
- HEAT, A.C.G. 1979. The temperature and humidity preferences of *Haemaphysalis longicornis*, *Ixodes holocyclus* and *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae): Studies on eggs. **Int. J. Parasitol.**, 9:33-39.
- HOOGSTRAAL, H. 1985. *In*: GAAFAR, S.M., HOWARD, W.E. & MARSH, R.E. *Parasites, Pests and Predators*. Ed. Elsevier, 575 p.
- HUSSEIN, H.S. & B.E. MUSTAFA. 1987. Temperature and humidity effects on the life cycle of *Haemaphysalis spinulosa* and *Rhipicephalus simus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, 24(1):77-81.
- IVANOVIC, J., M. JANKOVIC-HLADNI, S. DJORDJEVIC, S. STAMENOVIC & J. LAZAREVIC. 1992. The effect of high temperature on metabolism of *Morimus funereus* larvae during na intermoult period. **J. Insect Physiol.**, 38(11):877-883.

- JOANISSE, D.R. & K.B. STOREY. 1994. Mitochondrial enzymes during overwintering in two species of cold-hardy gall insects. **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, **24**(2):145-150.
- JONES, J.C. 1962. Current concepts concerning insect hemocytes. **Am. Zoologist.**, **2**:209-246.
- KAAYA, G.P. & N.A. RATCLIFFE. 1982. Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important dipterans. **J. Morphol.**, **173**:351-365.
- KOCH, H.G. & M.D. TUCK. 1986. Molting and survival of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) under different temperatures and humidities. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, **79**:11-14.
- KOSHY, T.J., G. RAJAVELU & C.M. LALITHA. 1983. On the life of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Cheiron**, **12**(6):337-338.
- KUHN, K.H. 1996. Mitotic activity of the hemocytes in the tick *Ixodes ricinus* (Acari; Ixodidae). **Parasitol. Res.**, **82**:511-517.

KUHN, K.H. & T. HAUG. 1994. Ultrastructural, cytochemical, and immunocytochemical characterization of the haemocytes of *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata). **Cell. Tissue Res.**, **277**:493-504.

KUHN, K.H., M. RITTIG, T. HÄUPL & G.R. BURMESTER. 1994. Haemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* express coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*. **Dev. Comp. Immunol.**, **18**:S115.

LACKIE, A.M. 1988. Haemocyte behaviour. **Ad. Insect Physiol.**, **21**:85-178.

LONDT, J.G.H. 1977. Oviposition and incubation in *Boophilus microplus* (Koch, 1844) (Acarina: Ixodidae). **Onderstepoort J. Vet. Res.**, **44**(1):13-20.

LUCKHART, S., M.S. CUPP & E.W. CUPP. 1992. Morphological and functional classification of the hemocytes of adult female *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). **J. Med. Entomol.**, **29**:457-466.

- MAHADEV, P.V.M. 1977. Life cycle, feeding behaviour and ovipositional ability of *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus* (Acarina: Ixodidae). **Indian J. Acar.**, **2**:12-20.
- MENEZES, H. & R. BASILE. 1982. A importância do estudo dos hemócitos em insetos. **Cienc. e Cult.**, **34**:454-464.
- MOSCONI, P.B., M.V. GERVASO & M. ORLANDI. 1989. Variazione nella popolazione di emociti durante l'ultimo stadio larvale e nell'adulto di *Periplaneta americana* e *Leucophaea maderae* (Blattodea). **Redia**, **72**:215-223.
- NASSAR, M.S., S.M. HAMMAD & A.S. EL-KOUDARY. 1971. The biology of the brown dog tick *Rhipicephalus s. sanguineus*. **Bull. Soc. Ent. Egypte**, **LV**:409-417.
- NEITZ, W.O., F. BOUGHTON & H.S. WALTERS. 1971. Laboratory investigation on the life cycle of karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). **Onderest. J. Vet. Res.**, **38**:215-224.
- NORDENSKIÖLD, E. 1905. Zur anatomie und histologie von *Ixodes reduvius*. **Zool. Anz.**, **28**:478-485.

NUTTALL, G.H.F. 1915. Biology of Ixodidae. **Parasitology**, **7**:448-456.

OUHELLI, H., V.S. PANDEY & M. CHOUKRI. 1982. The effects of temperature, humidity, photoperiod and weight of the engorged female on oviposition of *Boophilus annulatus* (Say, 1821). **Vet. Parasitol.**, **11**:231-239.

PRATA, M.C.A. 1998. **Efeitos de diferentes temperaturas sobre os processos de postura, eclosão e mortalidade de larvas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 75 p.

RAVINDRANATH, M.H. 1974. The hemocytes of a scorpion *Palamnaeus swammerdami*. **J. Morph.**, **144**:1-10.

ROSALES, A.L., E.S. KRAFSUR & Y. KIM. 1994. Cryobiology of the face fly and house fly (Diptera: Muscidae). **J. Med. Entomol.**, **31**(5):671-680.

- ROSS, I.C. 1924. The bionomics of *Ixodes holocyclus* Neumann with a redescription of the adult and nymphal stages and a description of the larvae. **Parasitology**, **16**:365-381.
- SANTARÉM, M.M., J.A.F. ROBLEDO & A. FIGUERAS. 1994. Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Dis. Aquat. Org.**, **18**:217-222.
- SHERMAN, R.G. 1973. Ultrastructurally different hemocytes in a spider. **Can. J. Zool.**, **51**:1155-1159.
- SOMERO, G.N. 1995. Proteins and temperature. **Annu. Rev. Physiol.**, **57**:43-68.
- SONENSHINE, D.E. 1970. A contribution to the internal anatomy and histology of the bat tick *Ornithodoros kelleyi* Cooley and Kohls, 1941. **J. Med. Ent.**, **7**:289-312.
- SRIVASTAVA, S.C. & M.G.R. VARMA. 1964. The culture of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Ixodidae) in the laboratory. **J. Med. Ent.**, **1**(2):154-157.

STOREY, K.B., D.G. McDONALD & C.E. BOOTH. 1986. Effect of temperature acclimation on haemolymph composition in the freeze-tolerant larvae of *Eurosta solidaginis*. **J. Insect. Physiol.**, 32(10):897-902.

SWEATMAN, G.K. 1967. Physical and biological factors affecting the longevity and oviposition of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks. **J. Parasitol.**, 53(2):432-445.

TSILENEVA, V.A. 1959. Formed elements of the hemolymph of ixodid ticks. **Dokl. Akad. Nauk. Tadzhik SSR**, 2(1):45-51 (Em Inglês: NAMRU 3-T 176).

TUKAHIRWA, E.M. 1976. The effects of temperature and relative humidity on the development of *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann (Acarina, Ixodidae). **Bull. Ent. Res.**, 66:301-312.

WHITTEN, J.M. 1969. Haemocyte activity in relation to epidermal cell growth, cuticle secretion, and cell death in a metamorphosing cyclorrhaphan pupa. **J. Insect Physiol.**, 15:765-778.

WOOLEY, T.A. 1988. **Acarology - Mites and Human Welfare**. Colorado State University.

YEAGER, J.F. 1945. The blood picture of the southern armyworm (*Prodenia eridania*). **J. Agr. Res.**, 71:1-40.

ZAIJIE, J., L. FENG, W. WENLIN, Z.J. JIANG, F. LI, W.L. WANG, F. DUSBABEK & V. BUKVA. 1991. Study on diapause of adult ticks of the genus *Dermacentor*. **Modern Acarol.**, II:571-579.