

## TIPOS CELULARES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Boophilus microplus* INOCULADOS COM *Metarhizium anisopliae* E *Penicillium* SP.

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

**ABSTRACT:-** SILVA, S.B. DA; SAVASTANO, G; BITTENCOURT, V.R.E.P. [Cellular types involved in the immune response of engorged females of *Boophilus microplus* inoculated with *Metarhizium anisopliae* and *Penicillium* sp.] Tipos celulares envolvidos na resposta imune de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Penicillium* sp. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 15, n. 3, p. 128-131, 2006. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

Engorged females of *Boophilus microplus* were inoculated with conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* or *Penicillium* sp. Two bioassays constituted of six treatment groups were performed to determine the cells involved in the *B. microplus* immune response. In the first bioassay there were three different groups: a) engorged females inoculated with *Penicillium* sp. ( $1.36 \times 10^8$  conidia/ml); b) engorged females inoculated with Tween 80 at 0.01% water solution; c) testimony group (engorged females non inoculated). Each treatment group was composed by ten ticks. The second bioassay was conducted following the same methodology described above, however, engorged females were inoculated with *M. anisopliae* ( $1.24 \times 10^8$  conidia/ml). Ticks were inoculated with 1µl of fungus suspension or Tween 80 solution directly in the idiosoma. The haemolymph of each tick was collected 24, 48 and 72 hours post-challenge. In all groups were observed prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes and spherulocytes. Adipohemocytes were identified in small number only in ticks non inoculated (testimony group). Oenocytoids were found in ticks inoculated with *M. anisopliae* and ticks non inoculated of both bioassays. In the first bioassay, ticks treated with *Penicillium* sp. presented conidial phagocytosis by granulocytes and plasmatocytes. In the second bioassay, ticks did not overcome the infection resulting in death 72 hours after post challenge.

**KEY WORDS:** Haemolymph, ticks, bioassays, entomopathogenic fungi.

### RESUMO

Para a determinação dos tipos celulares envolvidos na resposta imune de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Penicillium* sp. foram realizados dois ensaios biológicos, totalizando seis tratamento. Cada tratamento contendo dez carrapatos. O primeiro ensaio biológico foi composto por: a) grupo de fêmeas ino-

culadas com *Penicillium* sp. na concentração de  $1,36 \times 10^8$  conídios/ml; b) grupo inoculado com água e Tween 80; c) grupo testemunha (não recebeu inoculação). No segundo ensaio biológico foram formados os seguintes grupos: a) grupo de fêmeas inoculadas com *M. anisopliae* na concentração de  $1,24 \times 10^8$  conídios/ml; b) grupo inoculado com água e Tween 80; c) grupo testemunha (não inoculado). Nos grupos tratados, o volume inoculado foi 1µl na região dorsal do idiossoma. A hemolinfa foi coletada 24, 48 e 72 horas após inoculação. Em todos os ensaios biológicos foram observados prohemócitos, granulócitos, esferulócitos e plasmatócitos. Foram identificados ainda adipohemócitos em pequenas quantidades nos dois grupos controles. Os oenocitóides foram encontrados também nos grupos tratados com *M. anisopliae*.

<sup>1</sup> Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ, 23890-000. Bolsista CNPq. E-mail: samsil27@yahoo.com.br

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

e nas fêmeas não inoculadas em ambos ensaios biológicos. No primeiro ensaio biológico foi observada fagocitose conidial por granulócitos e plasmatócitos. No segundo ensaio biológico foi constatado a impossibilidade do carrapato em reagir à infecção, resultando em morte 72 horas após a inoculação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hemolinfa, carrapatos, ensaios biológicos, fungos entomopatogênicos.

*Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), conhecido como o carrapato do boi, possui uma ampla distribuição mundial na faixa compreendida entre os paralelos 32° de latitude N e 35° de latitude S e acarreta diversos prejuízos, tanto em relação às perdas na produtividade como em relação aos gastos para controle desta parasitose. Devido aos inconvenientes causados pelo uso indiscriminado de acaricidas químicos, outras medidas de controle vem sendo estimuladas, dentre elas a utilização de agentes biológicos (BITTENCOURT et al., 1994). Como uma medida alternativa ao controle químico, o fungo *Metarhizium anisopliae* vem sendo testado em laboratório e tem causado alterações em diferentes parâmetros biológicos da fase não parasitária em *B. microplus*, como demonstrado por Bittencourt et al. (1992, 1994, 1995).

Os invertebrados apresentam vários mecanismos de defesa para evitar a invasão e dispersão dos fungos em seu organismo. Nos insetos, a imunidade é classificada como natural, celular e humoral e segundo Alves (1998) a imunidade celular é realizada pelas células presentes na hemolinfa classificadas como prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, oenocitóides e coagulócitos. As reações de defesa ocorrem em dois estágios: no primeiro, granulócitos e coagulócitos localizam a partícula estranha e liberam fatores de reconhecimento, enquanto que no segundo estágio, estes fatores conduzem os plasmatócitos às lesões ou patógenos. A alteração na composição da hemolinfa dos insetos foram observadas após infecção com bactérias e vírus por Fisher e Ganesalingam (1970) e com fungos por Huxham et al. (1989).

No carrapato *Dermacentor andersoni* Stiles, (1905) foram observados quatro tipos celulares descritos como prohemócitos, esferulócitos, plasmatócitos e oenocitóides (BRINTON; BURGDORFER, 1971). Em *B. microplus* inoculados com bactérias para a observação da produção de reativos de oxigênio foram verificados dois tipos celulares apenas, plasmatócitos e granulócitos, considerando os plasmatócitos as células mais abundantes (PEREIRA et al., 2001) enquanto que em *Ornithodoros moubata* Murray, 1877 desafiados através da inoculação de microesferas de polistirene fluorescente foram identificados apenas granulócitos, plasmatócitos e prohemócitos. Contudo, como o sistema imune celular de *B. microplus* reage perante a inoculação com um agente fúngico ainda não está esclarecida. O objetivo deste trabalho foi verificar quais os hemócitos envolvidos na resposta imune do *B. microplus* quando inoculados com os fungos *M. anisopliae* e *Penicillium* sp.

A infecção experimental e a análise da resposta celular de *B. microplus* foram realizadas na Estação para Pesquisas Parasitológica W.O. Neitz - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foram executados dois ensaios biológicos com dois fungos: *Metarhizium anisopliae* e *Penicillium* sp., sendo utilizadas um total de sessenta fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* retiradas de animais naturalmente infestados do município do Rio de Janeiro que não tiveram contato recente com carrapaticidas. Após a coleta, as mesmas foram lavadas em água corrente, imersas em solução de hipoclorito de sódio a 0,01% e novamente lavadas em água destilada, secas, colocadas em placas de Petri e mantidas em câmara climatizada (27°C e >80% UR). Para a elaboração da suspensão foram utilizados os fungos *Penicillium* sp e o *M. anisopliae* isolado 959, sendo as suspensões de conídios de cada isolado preparadas a partir de fungos produzidos em meio de arroz. As diluições para cada isolado foram realizadas segundo descrição de Alves (1998) atingindo a concentração final de 10<sup>8</sup> conídios/ml e todos os grupos tratados constituídos por dez espécimes. O primeiro ensaio biológico foi constituído por um grupo testemunha (sem inoculação); um grupo inoculado com solução de tween 80 a 0,1% em água destilada estéril e um grupo foi tratado com a suspensão do fungo *Penicillium* sp. na concentração de 1,36 x 10<sup>8</sup> conídios/ml. Para o segundo ensaio biológico, foi mantida a mesma sequência de tratamento, porém como suspensão fúngica foi utilizada a preparada com *M. anisopliae* na concentração de 1,24 x 10<sup>8</sup> conídios/ml. Nos tratamentos com suspensão fúngica ou água destilada, os carrapatos foram inoculados na região dorsal do idiossoma com um volume de 1ml, utilizando uma microseringa Hamilton (10ml). A coleta de hemolinfa foi realizada 24, 48 e 72 horas após a inoculação pela secção da extremidade distal (tarso e tibia) das patas. A amostra foi fixada em álcool metílico (PA) por três minutos e corada com Giemsa a 0,02% durante 30 minutos. As células foram observadas em microscópio ótico (Inalh) em objetiva de 40x e 100x.

Nos ensaios biológicos realizados foram identificados seis tipos celulares: prohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides, sendo os dois últimos, os tipos celulares menos abundantes. Em *D. andersoni* foram observados quatro tipos celulares prohemócitos, esferulócitos, plasmatócitos e oenocitóides (BRINTON; BURGDORFER, 1971). Já, em *O. moubata* foram identificados apenas granulócitos, plasmatócitos e esferulócitos (INOUE et al., 2001). Em *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) e *Haemaphysalis* Koch, 1844 somente foram encontrados três tipos: prohemócitos, esferulócitos e plasmatócitos; granulócitos, prohemócitos e plasmatócitos, respectivamente (CARNEIRO; DAEMON, 2001).

No primeiro ensaio biológico, hemolinfa das fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* inoculadas com fungo apresentaram uma resposta celular diferenciada dos demais grupos testados, sendo observada a ocorrência de fagocitose dos conídios de *Penicillium* sp. por granulócitos e plasmatócitos (Figura 1), fato já citado por Omoto e Alves (1998) e por Levashina (2004),



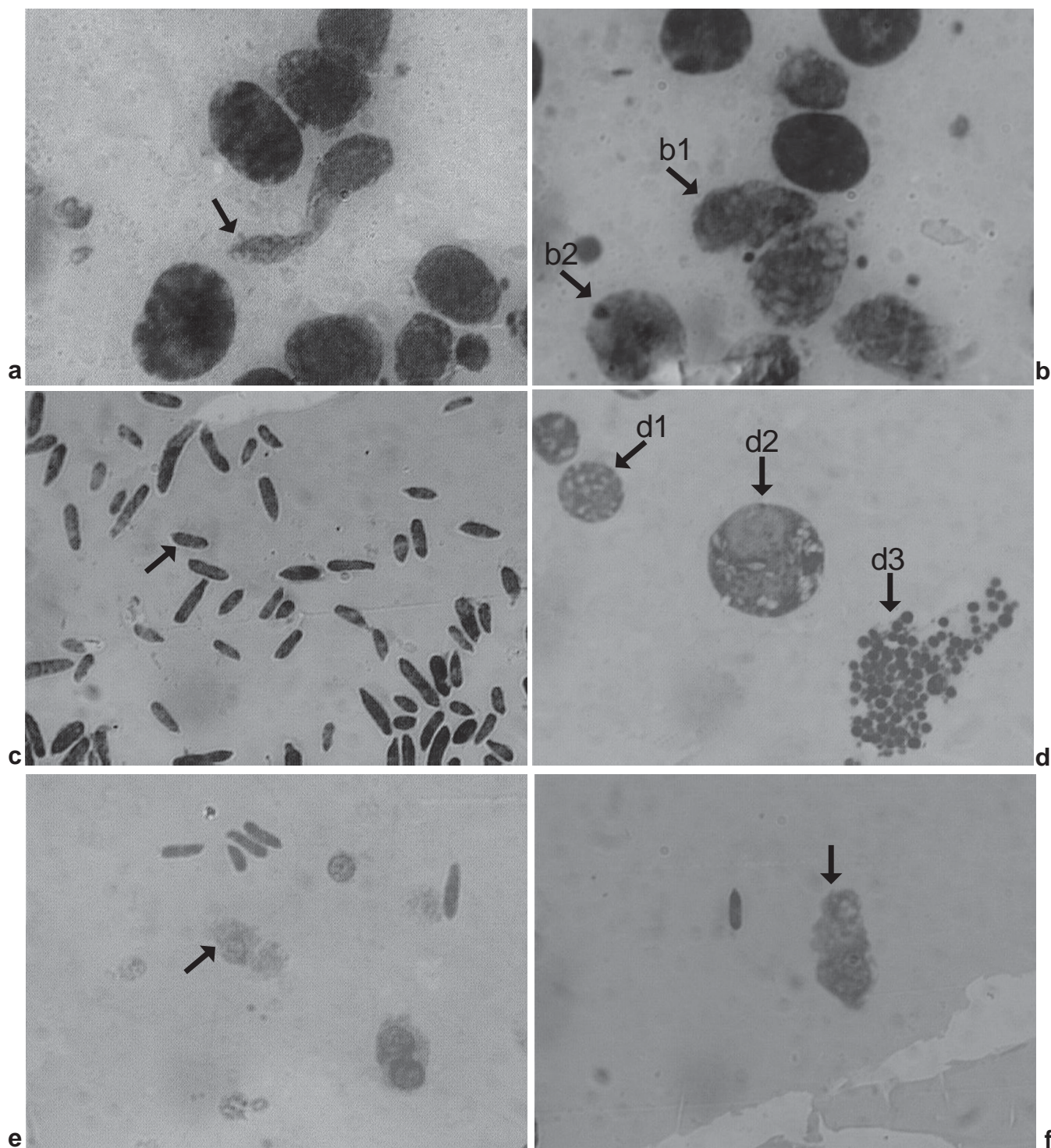


Figura 1. Amostras de hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* coradas pelo Giemsa (1000 X). (a) Conídios de *Penicillium* sp. (→) fagocitados por plasmatócitos, (b) 1- Plasmatócitos, 2- Conídios de *Penicillium* sp. fagocitados por plasmatócitos; (c) Conídios (→) de *Metarhizium anisopliae*; (d) 1- Granulócito, 2- Oenocitóide, 3- Degranulação de esferulócito; (e) conídios (→) de *M. anisopliae* e hemócitos em degeneração e (f) conídios de *M. anisopliae* e plasmatócitos em degeneração (→).

quando cita que estas são as principais células envolvidas no processo imune. Corroborando também as afirmações de Inoue et al. (2001) sobre o envolvimento de granulócitos no processo de fagocitose em *O. moubata*. Segundo Crossley (1975) a fagocitose é um dos principais mecanismos de resposta imune

dos invertebrados. No grupo inoculado com *Penicillium* sp., as fêmeas ingurgitadas fizeram sua postura normalmente, quando comparadas as do grupo controle, morrendo somente após o término da mesma. Adipohemócitos e oenocitóides foram consideradas células raras.

No segundo ensaio biológico, não foi observada fagocitose pelos tipos celulares encontrados nas fêmeas inoculadas com o *M. anisopliae* como constatado no ensaio biológico anterior. As amostras de hemolinfa coletadas após 48 horas da inoculação com *M. anisopliae* apresentaram esferulócitos em desgranulação, e também conídios e hifas do fungo (Figura 1). Em relação à distribuição do fungo pelo organismo do carrapato Bittencourt et al. (1995) observaram semelhante processo de dispersão das hifas na hemolinfa de *B. microplus* que sobreviveram por um período de sete dias, enquanto que no presente experimento as fêmeas tratadas morreram em média 72 horas após a inoculação do fungo. Foi constatado que mesmo sendo observada a presença de conídios fagocitados pelos hemócitos, o processo infeccioso não pode ser controlado, com posterior desenvolvimento e colonização do fungo *M. anisopliae*. Foi observada a presença dos mesmos tipos celulares em todos os grupos estudados.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed., Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 21-37.
- 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 parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. *Revista da 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 da Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 17, n. 1, p. 83-88, 1995.
- BRINTON, L.P.; BURGDORFER, W. 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 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 Insect Physiology*, v. 11, p. 117-222, 1975.
- FISHER, R.C.; GANESALINGAM, V.K. Changes in the compositions of host haemolymph after attack by an insect parasitoid. *Nature*, v. 227, n. 5254, p. 191-192, 1970.
- 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, 1989.
- 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.
- LEVASHINA, E.A. Innate immune response of *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, n. 7, p. 673-678, 2004.
- OMOTO, C.; ALVES, S.B. Mecanismos de defesa de insetos contra entomopatógenos. In: ALVES, S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.
- PEREIRA, L.S.; OLIVEIRA, P.L.; BARJA-FIDALGO, C.; DAFFRE, S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental Parasitology*, v. 99, n. 2, p. 66-72, 2001.

Recebido em 26 de dezembro de 2005.

Aceito para publicação em 07 de junho de 2006.