

Quantificação de hemócitos em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Beauveria bassiana* s.l.*

Maria Clemente de Freitas¹, Caio Júnior Balduino Coutinho-Rodrigues² Wendell Marcelo de Souza Perinotto³, Michel Ruan dos Santos Nogueira², Thamires Tavares Chagas¹, Allan Felipe Marciano⁴, Mariana Guedes Camargo⁵, Simone Quinelato⁶, Patrícia Silva Gôlo⁵, Fillipe de Araujo Sá⁷ e Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt^{7*}

ABSTRACT. Freitas M.C., Coutinho-Rodrigues C.J.B., Perinotto W.M.S., Nogueira M.R.S., Chagas T.T., Marciano A.F., Camargo M.G., Quinelato S., Gôlo P.S., Sá F.A. & Bittencourt V.R.E.P. [**Hemocytes quantification in *Rhipicephalus microplus* engorged females infected by *Beauveria bassiana* s.l.**] Quantificação de hemócitos em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Beauveria bassiana* s.l. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(Supl.1):63-70, 2015. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Anexo 1, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

Rhipicephalus microplus tick is an ectoparasite with a great negative impact for veterinary medicine. Under massive infestations cattle may present severe anemia; besides that, ticks can transmit pathogenic agents causing host death. Among the methods used to alternatively control ticks is the use of the arthropodpathogenic fungus *Beauveria bassiana* s.l. that has been considered promising due to the fungus capacity of penetration of full cuticle in all tick developmental stages, colonizing them and causing tick death. Arthropod immune response is basically composed of humoral and cellular components. Several cell types that actively work against microbial infection are present within the hemolymph. The aim of the present study was to evaluate the amount and identify hemocytes present in the hemolymph of *R. microplus* engorged females artificially inoculated with *B. bassiana* sensu lato (s.l.) conidia (isolate CG 206). Fungal suspension (1×10^8 conidia/mL) or Tween 0.01% (control group) were inoculated in *R. microplus* engorged females. Hemolymph collections were made through the female dorsal region (for quantitative analysis) and the distal section of the legs (for qualitative analysis) 24, 48 and 72 hours after fun-

*Recebido em 27 de outubro de 2015.

Aceito para publicação em 30 de novembro de 2015.

¹ Curso de Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mails: mariamedvetufrj@hotmail.com; mirisbrasil@hotmail.com - bolsista de iniciação científica FAPERJ; estagiária do setor de micologia da UFRRJ.

² Médico-veterinário, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), IV, Anexo 1, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mails: caio-jr@hotmail.com; michelnogueira2012@hotmail.com - bolsista CAPES.

³ Médico-veterinário, DSc. Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá, Avenida Beira Rio, 3100, Jardim Europa, Cuiabá, MT 78065-900. Email: wendellufrj@hotmail.com

⁴ Médico-veterinário, CPGCV, IV, Anexo 1, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: allan_sjc@yahoo.com.br

⁵ Médica-veterinária, DSc. CPGCV, IV, Anexo 1, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mails: marianagcamargo@hotmail.com; patricia_golo@yahoo.com.br - bolsista CAPES.

⁶ Médica-veterinária, DSc. Coleção de fungos filamentosos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Pavilhão Rocha Lima, Sala 525, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-360. E-mail: squinelato@gmail.com

⁷ Médico-veterinário, MSc. Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Bloco L, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-902. E-mail: llipesa@hotmail.com - bolsista doutorado em Química Biológica.

⁸ Médica-veterinária, PhD. DPA, IV, Anexo 1, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. *Autora para correspondência, E-mail: vaniabit@ufrj.br - bolsista CNPq.

gal inoculation. Hemocytes quantification was performed using a Neubauer chamber. Qualitative analysis was carried out by a smear of hemolymph on slides. Data were submitted to Mann-Whitney test for comparison of averages on a significance level of 5% ($p < 0.05$). Comparison between unexposed females and females exposed to *B. bassiana* s.l. showed that hemolymph from the fungus treated group presented significant reduced amount of hemocytes 24 hours after fungal inoculation. Total amount of hemocytes 48 hours after fungal inoculation was 49.5 times lower in comparison with the amount observed 24 after fungal exposure. The following hemocytes were identified in tick females' hemolymph: prohemocytes, granulocytes, plasmatocytes, spherulocytes and possible oenocytoids. Based on these results, it is concluded that inoculation of *B. bassiana* s.l. isolate CG 206 caused cellular alteration in the hemolymph of *R. microplus* females showing reduction of total amount of hemocytes 48 hours after fungal inoculation.

KEY WORDS. Hemocytes, cattle ticks, arthropodpathogenic fungi.

RESUMO. O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasito de grande importância em medicina veterinária. Grandes infestações com este parasito podem levar os bovinos a quadros severos de anemia, além de serem transmissores de agentes patogênicos culminando até mesmo na morte do hospedeiro. Dentre os métodos utilizados no controle alternativo de carrapatos, os fungos artropodopatogênicos como *Beauveria bassiana* s.l. vêm se destacando, devido à capacidade de penetração via cutícula integra das diversas fases de desenvolvimento do carrapato colonizando-os e levando-os a morte. A resposta imune gerada pelos artrópodes é basicamente composta de uma parte humoral e outra de origem celular. Diversos tipos celulares que atuam ativamente frente à infecção por patógenos estão presentes na hemolinfa. O objetivo deste trabalho foi avaliar a quantidade, e identificar os hemócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* infectadas artificialmente por inoculação de *B. bassiana* s.l. (isolado CG 206). Infecções artificiais foram feitas por inoculação de suspensão fúngica (1×10^8 conídios/mL) ou água destilada estéril e Tween 0,01% (grupo controle) em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Coletas de hemolinfa foram realizadas através da região dorsal das fêmeas (para análise quantitativa) e da secção distal das patas (para análise qualitativa) 24, 48 e 72 horas após inoculação do fungo. A quantificação dos hemócitos foi realizada com auxílio de câmara de Neubauer. A análise qualitativa dos hemócitos foi realizada através do esfregaço, em lâminas, de hemolinfa das fêmeas ingurgitadas com auxílio de microscópio óptico. Os dados obtidos foram submetidos ao teste Mann-Whitney para a comparação entre as médias em um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Observou-se que a quantidade de hemócitos na hemolinfa das fêmeas dos grupos

tratados com *B. bassiana* s.l. diminuiu significativamente quando comparado ao grupo controle, após 24 horas da inoculação fúngica. O número total de hemócitos do grupo 48 horas pós inoculação fúngica foi 49,5 vezes menor do que a quantidade observada 24 horas após inoculação. Foi possível identificar os seguintes hemócitos: pró hemócitos, granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos e possíveis oenocitóides. Baseando-se nos resultados obtidos conclui-se que a inoculação do isolado CG 206 de *B. bassiana* s.l. provocou uma alteração celular das fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* através da redução do número total de hemócitos 48 horas após inoculação.

PALAVRAS-CHAVE. Hemócitos, carrapato dos bovinos, fungos artropodopatogênicos.

INTRODUÇÃO

O carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* (Murrel & Barker 2003) causa grandes prejuízos na economia de diversos países. Esse carrapato encontra-se amplamente distribuído na América Central, América do Sul, Austrália, Oriente, Sul da Flórida e África (González 2002). Dentre os prejuízos causados pelo parasitismo deste artrópode, destacam-se a depreciação do couro, a transmissão de agentes patogênicos e as perdas na produção de leite e de carne. Medidas de controle do carrapato são, portanto, de grande necessidade neste contexto (Horn & Arteché 1985). Pesquisas relataram que no Brasil, devido ao hábito hematófago, à ação espoliativa e a transmissão de doenças, os prejuízos contabilizados tenham aumentado de 2 para 3,24 bilhões de dólares anuais (Grisi et al. 2002, 2014).

O controle biológico de *R. microplus* utilizando fungos artropodopatogênicos vem sendo estudado e tem se mostrado bastante efetivo. Os ascomice-

tos *Beauveria bassiana* sensu lato (s.l.) e *Metarhizium anisopliae* s.l. são os fungos artropodopatogênicos mais bem caracterizados e amplamente utilizados em programas de controle biológico de artrópodes (Alves 1998, Fernandes & Bittencourt 2008, Schrank & Vainstein 2010).

Beauveria bassiana s.l. apresenta a capacidade de penetrar na cutícula íntegra do artrópode, transpondo as barreiras iniciais, até atingir o interior do corpo dos invertebrados, e iniciando uma série de reações no organismo do hospedeiro, que podem ser classificadas em celulares e humorais (Dunn 1986, Gillespie et al. 1997, Omoto & Alves 1998, Lavine & Strand 2002, Levashina 2004). A resposta imune celular em invertebrados inclui mecanismos de defesa realizados com a participação de diferentes tipos celulares (Lackie 1988, Lavine & Strand 2002, Levashina 2004). Segundo Tanada e Kaaya (1993), em estudos utilizando insetos, os tipos celulares comumente observados são pró-hemócitos, granulócitos, esferulócitos, plasmatócitos e oenocitóides.

Carneiro & Daemon (1996) caracterizaram os hemócitos presentes na hemolinfa do carrapato descrevendo os pró-hemócitos como células pequenas, arredondadas ou ovoides, cujo núcleo ocupa quase todo o citoplasma celular. O citoplasma, restrito a uma estreita camada ao redor do núcleo apresenta diferentes graus de basofilia, podendo ou não apresentar inclusões citoplasmáticas; os plasmatócitos como células cujo citoplasma biofílico pode apresentar vacúolos e/ou grânulos, o núcleo é arredondado ou oval, fortemente eosinofílico e geralmente excêntrico. Sua forma varia podendo ser encontrado com formato alongado, piriforme ou arredondado; os esferulócitos são células de tamanho variável, arredondadas e ligeiramente ovais, núcleo eosinofílico, arredondado ou alongado e excêntrico. O citoplasma contém esférulas levemente biofílicas e eosinofílicas, de diversos tamanhos, que chegam a encobrir o núcleo. Frequentemente é observada a liberação destas esférulas e também podem conter vacúolos; granulócitos são células arredondadas ou ovais, com núcleo fortemente eosinofílico, de tamanho variável, central ou excêntrico, envolvido por um grande volume de citoplasma acidófilo, contendo granulações variando de finas à grosseiras, também eosinofílicas, que frequentemente mascaram a presença do núcleo; oenocitóides são células grandes arredondadas, com citoplasma levemente eosinofílico ou neutrofilico, homogêneo ou com pequenas granulações retráteis. O núcleo, relativamente pequeno em relação ao volume citoplasmático é eosinofílico e excêntrico.

Silva (2006), em seus estudos com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* infectadas com fungos artropodopatogênicos identificou cinco tipos de hemócitos circulantes, sendo eles: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e oenocitóides.

Em *R. microplus*, os plasmatócitos e granulócitos são os tipos celulares mais importantes, pois estão envolvidos no processo de nodulação, que é mecanismo de defesa de insetos que consiste na formação de nódulos para isolar patógenos. Os plasmatócitos são as células mais abundantes e os principais responsáveis pelo processo de fagocitose (Pereira et al. 2001).

A realização de mais estudos sobre o mecanismo celular de defesa do carrapato *R. microplus* frente a uma infecção fúngica por *B. bassiana* s.l. é de grande importância para o desenvolvimento do controle biológico utilizando fungos artropodopatogênicos. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta celular de fêmeas de *R. microplus* quando infectadas artificialmente por inoculação do fungo *B. bassiana* s.l. isolado CG 206 através de análises quantitativas e qualitativas de células presentes na hemolinfa do carrapato.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção da colônia de *Rhipicephalus microplus* e do isolado de *Beauveria bassiana* s.l.

A manutenção da colônia de *R. microplus* foi feita na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Foram utilizadas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* coletadas do piso das baias de bovinos artificialmente infestados e mantidos estabulados. O presente trabalho faz parte de um projeto submetido e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFRRJ tendo o seguinte número de protocolo 154/2011.

Após a coleta, as fêmeas ingurgitadas foram lavadas em água corrente e imersas por três minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% para que houvesse a higienização da cutícula, sendo posteriormente secas, identificadas e pesadas.

O isolado CG 206 de *B. bassiana* s.l. utilizado no presente trabalho foi cedido pela coleção de fungos filamentosos EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). Este isolado fúngico foi mantido sob condições controladas de temperatura e umidade (25 ± 1 °C e $\geq 80\%$ de umidade relativa) em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes da UFRRJ.

Preparo da suspensão fúngica

As suspensões fúngicas foram preparadas através da raspagem de conídios da superfície do meio de cultu-

ra, sendo posteriormente suspensos em água destilada estéril e Tween 80 a 0,01% (Luz et al. 1998). Seguindo a metodologia de Alves (1998), foi feita uma quantificação dos conídios através da câmara de Neubauer, ajustando a concentração em 1×10^8 conídios/mL para 15 mL de suspensão.

Tratamento das Fêmeas

As fêmeas foram divididas em seis grupos com pesos homogêneos, contendo 20 fêmeas em cada grupo: 3 grupos foram inoculados com a suspensão fúngica na concentração de 1×10^8 e os outros 3 grupos (grupos controle) foram inoculados apenas com água destilada e Tween 80 a 0,01%. Os grupos foram identificados de acordo com o tratamento que receberam (Bb para inoculação fúngica ou Ctr para inoculação com água destilada estéril) e o tempo de coleta da hemolinfa após o tratamento (24h ou 48h ou 72h), sendo assim, os grupos foram identificados como: Bb 24h, Bb 48h, Bb 72h, Ctr 24h, Ctr 48h e Ctr 72h. Cada grupo continha três réplicas.

No tratamento por inoculação, 5 μ L da suspensão conidial e/ou controle (água destilada e Tween 80 a 0,01%) foram inseridos na hemocele da fêmea ingurgitada pelo forame localizado entre o capítulo e o escudo dorsal, com auxílio de seringa ultra fina com agulha de 0,3 mm de diâmetro e microscópio estereoscópico (Johns et al. 1998).

Após o tratamento, as fêmeas foram dispostas em placas de Petri e acondicionadas em câmaras climatizadas com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de relativa $\geq 80\%$.

Coleta de hemolinfa para a quantificação de hemócitos

Foi realizada perfuração da cutícula na região dorsal das fêmeas com o auxílio de uma agulha de 0,3 mm de diâmetro, seguida por suave compressão do corpo do carrapato. A coleta da hemolinfa foi feita utilizando-se um capilar de vidro da mesma espessura da agulha, acoplado a uma borracha flexível (Angelo et al. 2010) 24, 48 e 72 horas após a inoculação da suspensão fúngica ou da água. As amostras foram alocadas em microtubos contendo 30 μ L de coquetel de inibidores de protease (Inhibit[®] Sigma-Aldrich) e 82 μ L de tampão salina (NaCl 1,5 M, EDTA 50 mM, pH 7,4) e mantidas no gelo durante toda a coleta. Posteriormente, foram centrifugadas a 5040 G durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C . Os hemócitos foram separados do plasma e ressuspensos em 50 μ L de PBS (tampão fosfato 0,1M, NaCl 1.5 M, pH 7.4).

Quantificação de hemócitos totais

A quantificação dos hemócitos foi feita após sua ressuspensão em 50 μ L de tampão fosfato pH 7,4 com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico.

Identificação dos hemócitos

Para a identificação dos hemócitos na hemolinfa foram utilizadas as mesmas fêmeas usadas para a contagem do número total de hemócitos, entretanto, a coleta de hemolinfa para identificação dos hemócitos foi feita a partir da secção da região distal do tarso de uma ou mais

patas e da leve compressão do corpo das fêmeas do carrapato, com auxílio de tesoura e pinça oftálmica, depositando a gota de hemolinfa formada em lâmina de vidro limpa (adaptado de Burgdorfer 1970). Após a coleta em lâminas, a gota de hemolinfa foi seca ao ar, fixada em metanol 95% por 15 segundos e deixada em corante de Giemsa (proporção de 1:9 de solução Tampão Sorensem pH 7,2) por 30 minutos. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de corante, secas ao ar e avaliadas sob microscópio óptico para a identificação dos hemócitos (Silva 2006).

Análise estatística

Para a avaliação da quantidade de hemócitos observados entre os diferentes tratamentos realizados e entre os diferentes tempos avaliados pós-inoculação foi utilizado o teste de Mann-Whitney para a comparação entre as médias em um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Viabilidade dos conídios

Através do teste de viabilidade, foi possível observar que o fungo utilizado no experimento estava viável, demonstrando percentual de germinação de 99% após 24 horas de incubação em meio BDA a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$.

Quantificação dos hemócitos totais

Não foi possível quantificar os hemócitos após 72 horas da inoculação com a suspensão conidial de *B. bassiana* s.l., pois o tratamento ocasionou a morte das fêmeas antes que fosse possível coletar a hemolinfa. Na Figura 1 é possível observar a ausência de postura, a presença de hemólise e início do processo de exteriorização fúngica nas fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* após a inoculação com a suspensão fúngica. Neste estudo, não houve diferença significativa no número total de hemócitos entre os grupos controle e tratado com a suspensão fúngica 24 horas após a inoculação. Entretanto, ao comparar os grupos controle e tratado com a suspensão fúngica após 48 horas da inoculação observou-se redução de 205,1 vezes no número de hemócitos no grupo tratado com a suspensão fúngica. Foi observado aumento significativo no número de hemócitos no grupo controle após 48 horas da inoculação quando comparado ao grupo controle após 24 horas da inoculação. Entretanto, ao comparar os dois grupos tratados com a suspensão fúngica, pode-se perceber redução significativa no número de hemócitos 48 horas após a inoculação quando comparado ao grupo tratado 24 horas após a inoculação (Tabela 1). Os hemócitos contabilizados na câmara de Neubauer tiveram seus valores ajustados para 10^4 conídios/mL.

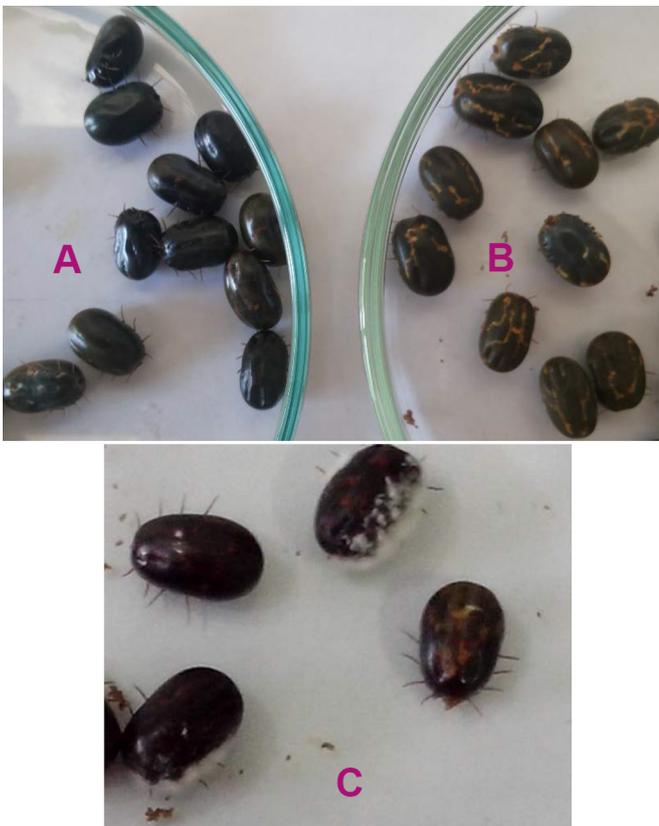


Figura 1. Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* 72 horas após a inoculação com a suspensão conidial de *Beauveria bassiana* s.l. (A) e com a suspensão de água destilada estéril e Tween 80 a 0,01% (B). Em destaque, nota-se o processo de exteriorização fúngica na cutícula (C) das fêmeas ingurgitadas do carrapato 72 horas após a inoculação com a suspensão fúngica.

Tabela 1. Média e desvio padrão do número total de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após 24 e 48 horas da inoculação com suspensão conidial de *Beauveria bassiana* s.l. ou água destilada estéril e Tween 80 a 0,01%.

Grupos	Tempo Pós-Inoculação	
	24 h	48 h
CTR	4,02 ^{aA} ± 1,20	20,51 ^{aB} ± 0,10
Bb 206	4,92 ^{aA} ± 1,47	0,10 ^{bB} ± 0,09

* Letras minúsculas na mesma coluna maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si (p>0,05) pelo teste de Teste t (Student).

Identificação de células presentes na hemolinfa

Foram identificados cinco tipos de hemócitos, sendo eles: pró-hemócitos (Figura 2A), plasmatócitos (Figura 2B), esferulócitos (Figura 2C), granulócitos (Figura 2D) e oenocitóides (Figura 2E). O tratamento das fêmeas com a inoculação da suspensão aquosa de *B. bassiana* s.l. (isolado CG 206) não alterou a morfologia dos hemócitos, de modo que os mesmos tipos celulares foram encontrados nos grupos inoculados com a suspensão fúngica e nos inoculados somente com água destilada estéril e Tween 80 a 0,01%.

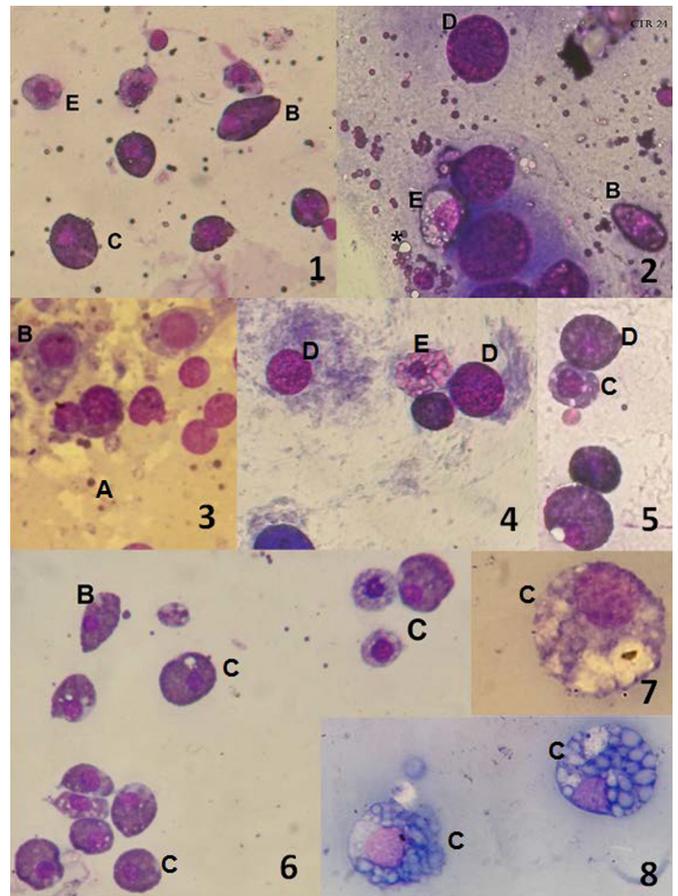


Figura 2. Tipos celulares presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* 24 e 48 horas após a inoculação de suspensão conidial de *Beauveria bassiana* s.l. (Bb 206) ou água destilada estéril e Tween 80 a 0,01% (CTR). (1, 2 e 3) CTR 24 hs; (4 e 5) Bb 24hs; (6) CTR 48hs; (7 e 8) Bb 48 hs, A= Pró- hemócitos, B= Plasmatócitos, C= Esferulócitos, D= Granulócitos, E= Oenocitóides. *Processo de degranulação.

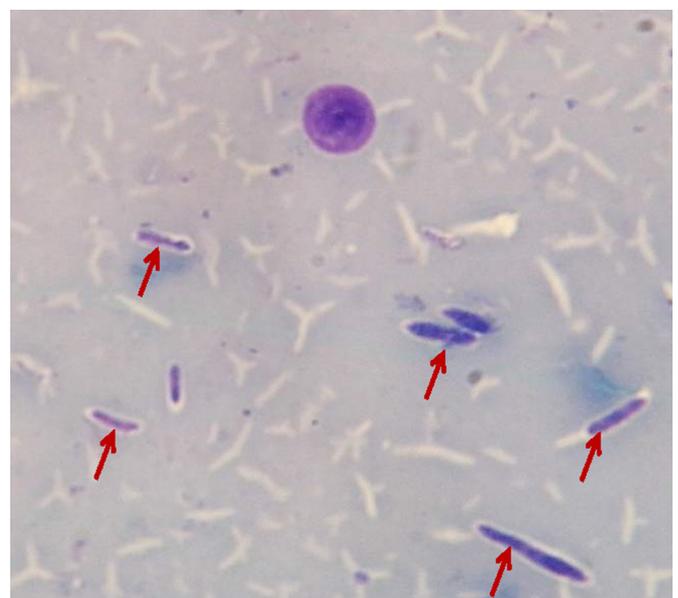


Figura 3. Corpos hifais (setas) na hemolinfa de *Rhipicephalus microplus* 48 horas após inoculação de suspensão aquosa de *Beauveria bassiana* s.l. (CG 206).

A identificação dos hemócitos das fêmeas ingurgitadas do grupo 72 horas após a inoculação de *B. bassiana* s.l. não foi possível já que as mesmas morreram antes da coleta de hemolinfa.

O presente estudo observou a presença de corpos hifais, que é a primeira estrutura formada a partir da germinação do conídio para assim formar as demais estruturas da colônia fúngica, 48 horas após a inoculação de *B. bassiana* s.l. (Figura 3).

DISCUSSÃO

A utilização dos fungos artropodopatogênicos vem se tornando uma alternativa promissora no controle de carrapatos de importância médica e médica veterinária. Várias espécies de destes fungos são conhecidas por causar mortalidade em diferentes estágios de desenvolvimento de carrapatos (Fernandes & Bittencourt 2008).

Os hemócitos representam um importante papel nos mecanismos de defesa de carrapatos e assim como nos insetos, a fagocitose é uma das primeiras linhas de defesa após um desafio microbiano (Zhioua et al. 1997). Eles fazem a retirada dos patógenos da hemolinfa através da fagocitose, nodulação, encapsulamento, além da produção e secreção de peptídeos com atividade antimicrobiana (Levashina 2004). O presente trabalho demonstrou que a inoculação do isolado CG 206 do fungo *B. bassiana* s.l. altera a resposta celular das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

O grupo controle 48 horas após a inoculação apresentou aumento significativo do número de hemócitos quando comparado ao grupo controle 24 horas após a inoculação. Para os grupos tratados com *B. bassiana* s.l., após 48 horas de inoculação, a contagem de hemócitos foi cerca de cinco vezes maior do que 24 horas após a inoculação. Estes resultados encontrados no presente trabalho corroboram com os estudos de Angelo (2011) que observou em coletas 48 horas após inoculação que o grupo controle apresentou aumento significativo em relação ao grupo observado 24 horas após inoculação.

Comparando as análises de 24 horas e 48 horas após a inoculação de água e Tween 0,01% (Tabela 1) observou-se um aumento significativo no número de hemócitos. Sugere-se que este aumento, também observado por Angelo (2011), seja em função da inoculação do veículo, que por si só pode gerar uma resposta celular no organismo do artrópode. Como esses grupos não foram inoculados com a suspensão fúngica o organismo das fêmeas ingurgitadas foi capaz de aumentar o número de hemócitos a fim de tentar debelar a presença de um possível

patógeno, o mesmo não aconteceu quando as fêmeas foram inoculadas com a suspensão fúngica de *B. bassiana* s.l. e após 48 horas da inoculação houve uma redução do número de hemócitos, demonstrando o efeito imunossupressor de *B. bassiana* s.l.

Segundo Wang et al. (2004), após a penetração do fungo, inicia-se o processo de colonização em que as hifas sofrem engrossamento, ramificam-se e diferenciam-se em blastosporos na hemocele do hospedeiro. O grupo tratado 24 horas após o tratamento não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle 24 horas já que esse período de 24 horas não foi suficiente para alterar a quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa do grupo tratado.

Silva et al. (2006) observaram redução no número de hemócitos presentes na hemolinfa de *R. microplus* quando infectados por *B. bassiana* s.l., demonstrando o efeito tóxico/imunossupressor deste patógeno sobre o carrapato ao longo dos dias após a infecção. Neste estudo, o grupo tratado com a suspensão de *B. bassiana* s.l. também apresentou redução de 49,5 vezes no número de hemócitos totais circulantes na hemolinfa de fêmeas de *R. microplus* 48 horas após a inoculação, quando comparado ao grupo tratado com a mesma suspensão fúngica 24 horas após a inoculação.

Alves (1998) observou que utilizando o método de inoculação do fungo diretamente no interior da hemocele do carrapato o processo de infecção e esporulação do fungo acontecia de forma mais rápida, pois reduz o tempo necessário à etapa de penetração do fungo via cutícula, que é a primeira fase do processo natural de infecção de artrópodes.

Neste estudo, pôde-se observar em contagem direta a presença de corpo hifal 48 horas pós-tratamento. Bittencourt e colaboradores (1995) visualizaram a presença das hifas de *M. anisopliae* na hemolinfa da pata de fêmeas totalmente ingurgitadas tratadas por imersão, a partir do segundo dia de tratamento (Figura 4).

A redução no número de hemócitos nos grupos inoculados com suspensão fúngica foi mais acentuada do que a reportada por Angelo (2011). Esta autora utilizou o isolado ESALQ 986 de *B. bassiana* s.l. para a inoculação de fêmeas ingurgitadas e o presente estudo utilizou o isolado CG 206. Comparando a virulência destes isolados para o controle de larvas de *R. microplus*, Fernandes et al. (2011) reportaram que o isolado CG 206 apresentou percentual de controle de até 93%, enquanto que o isolado ESALQ 986 apresentou percentual de controle máximo de 58,5%. Esta diferença indica que o isolado

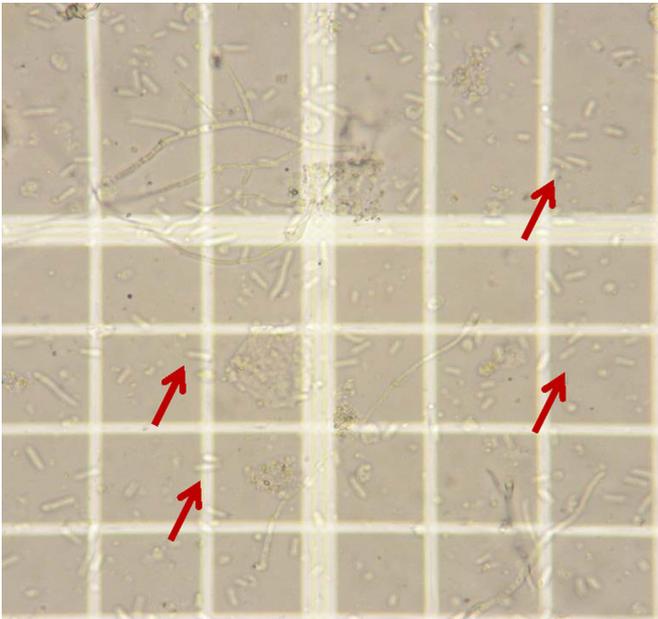


Figura 4. Presença de corpos hifais (setas) na hemolinfa de *Rhipicephalus microplus* após 48 horas da inoculação de *Beauveria bassiana* s.l.

utilizado no presente estudo (CG 206) é mais virulento do que o utilizado por Angelo (2011) (ESALQ 986). Dessa forma, sugere-se que um isolado fúngico mais virulento pode causar uma maior supressão celular em resposta ao processo infeccioso.

Muitos metabólitos secundários (derivados de vários intermediários no metabolismo primário), produzidos por fungos, podem ser potencialmente tóxicos para artrópodes (Rohlf & Churchill 2011), citando como exemplo as toxinas produzidas por *Beauveria* spp., conhecidas a oosporeina, beauvericina e bassianolide (Castrillo et al. 2005). Estes metabólitos ou toxinas podem causar um efeito imunossupressor nos hemócitos de *R. microplus*, levando a uma redução significativa do número de células circulantes (Silva 2006).

Segundo Chandler (2000), a morte do hospedeiro infectado com fungos artropodopatogênicos ocorre em um período de três a dez dias e se dá pela perda de água, privação de nutrientes, danos mecânicos e ação de toxinas. Sob condições adequadas de umidade e temperatura ocorre a exteriorização do fungo que recobre o corpo do carrapato, facilitando a ocorrência de novas infecções em outros hospedeiros e assim continuando seu ciclo. Neste estudo as fêmeas morreram 48 horas após a inoculação do fungo, período no qual houve grande redução do número de hemócitos observados. Silva et al. (2006) descreveram o mesmo 72 horas pós inoculação com conídios de *B. bassiana* s.l. em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Os hemócitos foram identificados conforme a morfologia descrita na literatura, sen-

do possível identificar na hemolinfa das fêmeas de carrapato os tipos celulares mais comuns em insetos segundo Tanada e Kaaya (1993), e os mesmos identificados em estudos de Silva (2006), sendo eles: pró-hemócitos, granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos e possíveis oenocitóides, segundo Sorenshine (1991) esses são os tipos celulares mais comumente encontrados na hemolinfa de artrópodes.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciaram que a inoculação de conídios do fungo artropodoptogênico *B. bassiana* s.l. alterou a resposta celular de fêmeas totalmente ingurgitadas de *R. microplus*, causando a diminuição da quantidade de hemócitos.

Agradecimentos. Esta pesquisa foi financiada pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Vânia R.E.P. Bittencourt é bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

REFERÊNCIAS

- Alves S.B. Quantificação de inóculo de patógenos de inseto. In: Alves, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed., FEALQ, Piracicaba, 1998, p.765-777.
- Angelo I.C., Gôlo P.S., Camargo M.G., Kluck G.E.G., Foly E. & Bittencourt V.R.E.P. Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57:79-83, 2010.
- Angelo I.C. *Avaliação dos perfis protéico e lipídico na resposta de Rhipicephalus microplus à infecção com fungos*. (Tese de doutorado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011. 141p.
- Bittencourt V.R.E.P., Massard C.L. & Lima A.F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, 17:83-88, 1995a.
- Burgdorfer W. Hemolymph test: A technique for detection of rickettsiae in tick. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 19:1010-1014, 1970.
- Carneiro M.E. & Daemon E. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Ixodoidea, Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13:609-620, 1996.
- Castrillo L.A., Roberts D.W. & Vandenberg J.D. The fungal past, present, and future: germination, ramification, and reproduction. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89:46-56, 2005.
- Chandler D., Davidson G., Pell J.K., Ball B.V., Shaw K. & Sunderland K.D. Fungal biocontrol of Acari. *Biocontrol Science and Technology*, 10:357-384, 2000.
- Dunn P.E. Biochemical aspects of insect immunology. *Annual Review of Entomology*, 31:321-339, 1986.
- Fernandes E.K.K. & Bittencourt V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental and Applied Acarology*, 46:71-93, 2008.
- Fernandes E.K.K., Angelo I.C., Rangel D.E.N., Bahiense T.C., Moraes A.M.L., Roberts D.W. & Bittencourt V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 182:307-318, 2011.

- Gillespie J.P. & Kanost M.R. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42:611-642, 1997.
- González J.C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Revisão histórica e conceitual). *Hora Veterinária*, 21:23-28, 2002.
- Grisi L., Massard C.L., Borja G.E.M. & Pereira J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Veterinária*, 21:23-28, 2002.
- Grisi L., Martins J.R., Barros A.T., Andreotti R., Caçado P.H.D., León A.A., Pereira J.B. & Villela H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23:150-156, 2014.
- Horn S.C. & Artech C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. *Hora Veterinária*, 4:12-32, 1985.
- Johns R., Sonenshine D.E. & Hynes W.L. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *Journal of Medical Entomology*, 35:458-464, 1998.
- Lackie A.M. Haemocytes behavior. *Advances in Insects Physiology*, 21:85-177, 1988.
- Lavine M.D. & Strand M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32:1295-1308, 2002.
- Levashina E.A. Innate immune response of *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34:673-678, 2004.
- Luz C., Tigano M.S., Silva I.G., Cordeiro C.M.T. & Aljanabi S.M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93:839-846, 1998.
- Murrell A. & Barker S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56:169-172, 2003.
- Omoto C. & Alvez S.B. Mecanismos de defesa de insetos contra entomopatógenos. In: Alves S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. FEALQ, Piracicaba, 1998. 1163p.
- 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*, 99:66-72, 2001.
- Rohlfs M. & Churchill A.C. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genetics and Biology*, 48:23-34, 2011.
- Schrank A. & Vainstein M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56:1267-1274, 2010.
- Sonenshine D.E. *Biology of Ticks. Vol.1*. Oxford University Press, New York, 1991. 465p.
- Silva S.B. *Identificação e quantificação de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de Boophilus microplus inoculados com fungos Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana, Penicillium corylophilum e Fusarium oxysporum*. (Tese de Doutorado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006. 60p. (Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp019506.pdf>)
- Tanada Y. & Kaaya H. K. *Insect Pathology*. Academic Press Inc. Elsevier, London, 1993. 517p.
- Wang C., Skrobek A. & Butt T.M. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85:168-174, 2004.
- Zhioua E., Yeh M.T. & Lebrun R.A. Assay for phenoloxidase activity in *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis*. *Journal of Parasitology*, 83:553-554, 1997.