

SCIENTIFIC NOTE

Caracterização dos Hemócitos de Operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) e Avaliação Hemocitária após Parasitismo por *Metarhizium anisopliae*

FRANKLIN M CUNHA¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA¹, ÁLVARO A C TEIXEIRA², AURISTELA C ALBUQUERQUE^{1,3}, LUIZ C ALVES⁴, ÉLZA A L A LIMA⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, ukento@yahoo.com.br; ²Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal, valeria@dmfa.ufrpe.br; ³Depto. de Biologia, auritermes@yahoo.com.br; UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE; ⁴Lab. de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE, Av. Moraes Rego s/n, 50670-420, Recife, PE; ⁵Lab. de Controle Biológico, Depto. de Micologia/CCB, UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves Cidade Universitária, s/n, 50670-420, Recife, PE

Edited by Italo Delalibera Jr – ESALQ/USP

Neotropical Entomology 38(2):293-297 (2009)

Hemocyte Characterization of *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) Workers and Hemocyte Evaluation after Parasitism by *Metarhizium anisopliae*

ABSTRACT - We aimed to characterize the morphology and ultrastructure of hemocytes of *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) workers and to quantify the cell types 24h, 48h and 72h after inoculation with *Metarhizium anisopliae*. Six hemocytes types were identified, plasmatocyte, granulocyte, spherulocyte, prohemocyte, adipohemocyte and eonocytoid. Hemocytes did not present any morphological alteration at the several observation periods, but they did have a change in their abundance, as observed for spherulocytes, adipohemocytes and eonocytoids at all intervals, and for plasmatocytes and granulocytes at 48h after host inoculation. We argue on the possible reasons and implications of the observed changes.

KEY WORDS: Ultrastructure, entomopathogenic fungus, insect hemocyte

RESUMO - O objetivo desta pesquisa foi caracterizar morfológica e ultraestruturalmente os hemócitos de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) e quantificar os tipos celulares 24h, 48h e 72h após inoculação com *Metarhizium anisopliae*. Seis tipos de hemócitos foram identificados: plasmatócito, granulócito, esferulócito, prohemócito, adipohemócitos e oenocitóide. Nenhuma alteração na morfologia dessas células foi evidenciada durante os intervalos. Entretanto, houve variações na proporção dos hemócitos em relação à testemunha para esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides, nos três intervalos de avaliação, e para plasmatócitos e granulócitos no intervalo de 48h. As causas potenciais dessa variação e suas implicações são apresentadas e discutidas neste artigo.

PALAVRAS-CHAVE: Ultra-estrutura, fungo entomopatogênico, hemócito de insetos

O sistema imunológico dos insetos caracteriza-se por mediar a reação humoral, responsável pelos processos de coagulação, melanização e produção de peptídeos antimicrobianos (Vilmos & Kurucz 1998), e a reação celular, mediada pelos hemócitos (Silva 2002), que envolve a fagocitose, formação de nódulos e encapsulação (Barracco & Menezes 1984, Lavine & Strand 2002).

Nos últimos anos, pesquisas sobre respostas imunes têm focado aspectos humorais, deixando aquelas mediadas pelos hemócitos com uma lacuna e dificultando o melhor entendimento dos mecanismos imunológicos (Lavine & Strand 2002). Como reflexo, as dificuldades de padronização da nomenclatura e de identificação dos tipos de hemócitos

são visíveis (Gupta 1985, Willott *et al* 1994).

Nasutitermes coxipoensis (Holmgren) tem ampla distribuição, ocorrendo em cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil (Miranda *et al* 2004), podendo ainda causar danos em arroz, café, milho, algodão e frutíferas (Constantino 2002).

Metarhizium anisopliae é um dos fungos mais utilizados em programas de manejo integrado de pragas (MIP), demonstrando grande eficiência para a Ordem Isoptera (Neves & Alves 1999, Sun *et al* 2002, Albuquerque *et al* 2005). Entretanto, em alguns casos, a lentidão no processo de infecção por alguns isolados torna-se um inconveniente para seu uso, pois nas relações patógeno/hospedeiro, os primeiros distúrbios detectados na hemolinfa disparam

reações de defesa dos hemócitos, na tentativa de eliminar o agente invasor ou limitar seu desenvolvimento. Estudos sobre esses mecanismos podem sugerir o desenvolvimento de estratégias eficientes para o controle de pragas (Gunnarsson & Lackie 1985, Alves & Pereira 1998). Assim, este trabalho objetivou caracterizar morfológica e ultraestruturalmente os hemócitos de operários de *N. coxipoensis*, além de quantificar diferencialmente os tipos celulares quando desafiados por *M. anisopliae*, na concentração 10^7 conídios/ml, nos intervalos 24h, 48h e 72h.

Os cupinzeiros foram obtidos em canavial no município de Itambé, PE e o fungo *M. anisopliae* PL₄₃, isolado de *Mahanarva posticata* (Stål), obtido da micoteca da Universidade Federal de Pernambuco. Hemolinfa de 100 operários foi coletada utilizando-se a técnica de Brayner *et al* (2005) e processada para microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

A contagem diferencial foi realizada de acordo com Falleiros *et al* (2003), após a pulverização de 300 operários com *M. anisopliae* na concentração de 10^7 conídios/ml. A hemolinfa foi coletada 24h, 48h e 72h após a pulverização, sendo a testemunha pulverizada com água esterilizada mais Tween 80. Para cada tratamento avaliaram-se 10 lâminas, contendo hemolinfa de 10 indivíduos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), utilizando o programa estatístico ASSIST (Versão 7.3).

Seis tipos de hemócitos foram encontrados em operários de *N. coxipoensis*. Os plasmatócitos mostraram polimorfismo, núcleo volumoso, pouco heterocromático e citoplasma contendo numerosas vesículas, alguns exibindo prolongamentos citoplasmáticos (Fig 1A). Os granulócitos apresentaram formato esférico ou oval, citoplasma com grânulos pequenos, basófilos, geralmente esféricos e elétrondensos; núcleo morfológicamente irregular (Fig 1B). Os esferulócitos exibiram morfologia esférica com núcleo eucromático e central, citoplasma com numerosas esféricas, contendo grânulos elétrondensos (Fig 1C). Os prohemócitos variaram de esféricos a ovais; núcleos volumosos e heterocromáticos, ocupando quase todo o citoplasma (Fig 1D). Os adipohemócitos apresentaram numerosas gotículas lipídicas de tamanho e forma variadas, ocupando quase todo o citoplasma, além de algumas mitocôndrias, núcleo excêntrico, com nucléolo evidente (Fig 1E). Os oenocitóides foram as maiores células observadas, com morfologia esférica bastante uniforme e núcleo central, sendo observados ribossomos, vesículas e alguns grânulos no citoplasma (Fig 1F).

Na testemunha, os plasmatócitos, mostraram redução significativa apenas no intervalo de 48h em relação ao de 24h, enquanto que os prohemócitos, adipohemócitos e oenocitóides aumentaram significativamente no mesmo intervalo de tempo. Os granulócitos e esferulócitos não diferiram estatisticamente nos intervalos estudados. Nos insetos tratados, os plasmatócitos diferiram significativamente da testemunha no intervalo de 48h, apresentando declínio significativo no intervalo de 72h, porém não diferindo da testemunha. Os granulócitos apresentaram aumento significativo no intervalo de 72h.

Redução significativa também foi evidenciada para

os esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides quando comparados à testemunha nos três intervalos. Os prohemócitos não sofreram variações significativas ao longo dos intervalos estudados (Tabela 1). Não foram observadas alterações morfológicas dos hemócitos em decorrência do processo de infecção pelo fungo.

Os hemócitos encontrados em *N. coxipoensis*, bem como as suas características morfológicas e ultra-estruturais, foram similares àqueles relatados na literatura para Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattodea, Coleoptera, Hymenoptera e Hemiptera (Silva *et al* 2000, Hillyer & Christensen 2002, Falleiros *et al* 2003, Ling *et al* 2003, Brayner *et al* 2005). Essas informações contribuem para o melhor conhecimento dos tipos de hemócitos entre as ordens de insetos, pois as diferenças morfológicas entre os mesmos, no que diz respeito à aparência geral, características nucleares e citoplasmáticas, são de grande importância para padronização do sistema de classificação a ser aplicado ao Filo Arthropoda ou Classe Insecta (Barduco *et al* 1988, Kurihara *et al* 1992, Hillyer & Christensen 2002).

Embora tenha sido observada redução significativa dos plasmatócitos na testemunha após 48h, no intervalo de 72h a redução já não era significativa em relação ao intervalo de 24h, sugerindo a flutuação fisiológica normal dessas células. Já o aumento significativo dos plasmatócitos a 48h em relação à testemunha e seu posterior declínio no intervalo de 72h, não diferindo da testemunha, pode estar relacionado à presença de metabólitos secundários tóxicos produzidos pelo fungo; estudos têm demonstrado a suscetibilidade dessas células quando insetos são inoculados com fungos entomopatogênicos, dependendo da concentração utilizada. Além disso, esses fungos podem inibir a atividade fagocitária dos plasmatócitos e evitar a detecção dos seus corpos hifais, prejudicando a defesa do hospedeiro (Vilcinskas *et al* 1997, Fuguet & Vey 2004, Wang & St. Leger 2006).

Segundo Pech & Strand (1996) os granulócitos são requeridos para iniciar, mediar e terminar o processo de encapsulação. Inicialmente formam uma monocamada sobre o corpo estranho, sendo seguidos pelos plasmatócitos e finalizando com outra monocamada sobre os plasmatócitos agregados. Esses mesmos autores verificaram ainda que granulócitos e plasmatócitos são incapazes de realizar o processo de encapsulação independentemente. Assim a redução dos granulócitos 48h após tratamento pode ter resultado da agregação inicial ao corpo estranho, tornando sua identificação difícil. Porém, com o declínio dos plasmatócitos no intervalo de 72h após tratamento, em decorrência dos possíveis efeitos discutidos acima, não foi possível a complementação do processo de encapsulação e/ou formação de novas cápsulas, levando ao aumento dos granulócitos. A diminuição dos esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides pode ocorrer porque eles não têm função específica na defesa celular e, por consequência, são mais vulneráveis aos patógenos (Lanot *et al* 2001, Lavine & Strand 2002).

A flutuação hemocitária na testemunha, ao longo do tempo, pode ocorrer porque os hemócitos são capazes de responder rapidamente a mudanças para atender as diversas funções fisiológicas requeridas pelo seu metabolismo (Han

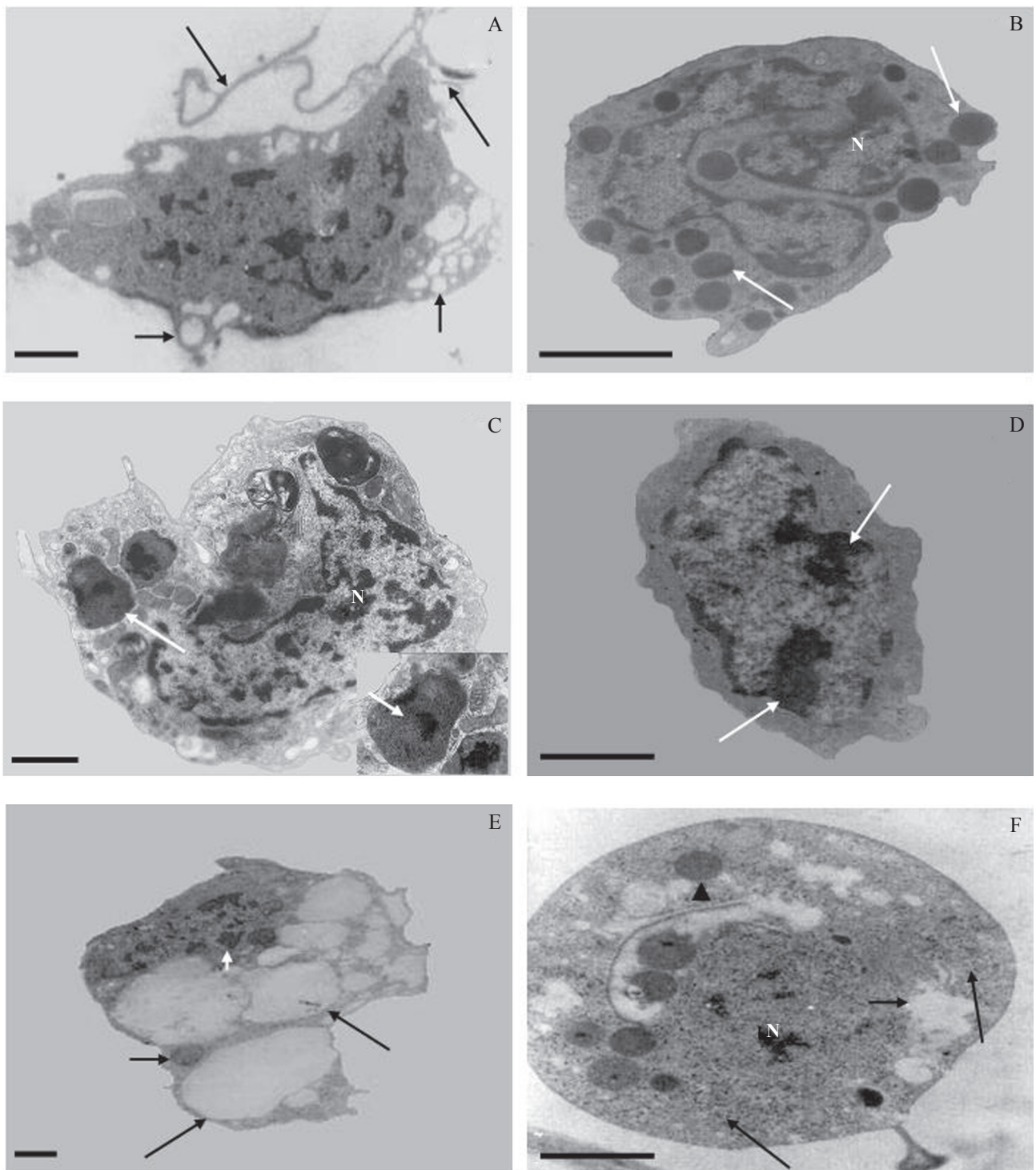


Fig 1 Hemócitos de *Nasutitermes coxipoensis*. A - Plasmatócito - célula com prologamentos citoplasmáticos (setas longas) e numerosas vesículas (setas curtas). B - Granulócito - grânulos elétron-densos (setas) e núcleo de morfologia irregular (N). C - Esferulócito com esférulas citoplasmáticas típicas (seta) e núcleo eucromático (N). Em detalhe, esférula contendo grânulo elétron-denso (seta pequena). D - Prohemócito - núcleo apresentando regiões com grande quantidade de heterocromatina (setas). E - Adipohemócito - gotículas lipídicas no citoplasma (setas longas), mitocôndrias (seta curta) e núcleo com nucléolo evidente (ponta de seta). F - Oenocitóide - citoplasma com numerosos ribossomos livres (setas longas), várias vesículas (setas curtas), alguns grânulos pouco-elétron-densos (ponta de setas) e núcleo pequeno (N). Barras = 1 μ m.

Tabela 1 Porcentagem diferencial média (\pm desvio padrão) dos hemócitos de operários de *Nasutitermes coxipoensis* após infecção por *Metarhizium anisopliae*.

Tratamento	Tempo após tratamento (h)			Estatística F ^P
	24	48	72	
Plasmatócitos				
Testemunha	71,5 \pm 4,28 a	55,4 \pm 2,72 b	64,4 \pm 4,06 ab	4,59 ^{0,0192}
<i>M. anisopliae</i>	75,3 \pm 1,37 a	77,2 \pm 3,18 a*	64,3 \pm 3,50 b	6,02 ^{0,0069}
F ^P	- ¹	27,07 ^{0,0005}	-	
Granulócitos				
Testemunha	14,0 \pm 2,32	20,8 \pm 1,53*	17,4 \pm 2,28	-
<i>M. anisopliae</i>	13,5 \pm 1,77 b	11,7 \pm 2,56 b	24,7 \pm 3,72 a	6,25 ^{0,0059}
F ^P	-	9,20 ^{0,0072}	-	
Prohemócitos				
Testemunha	8,1 \pm 1,34 b	12,3 \pm 0,79 a	9,8 \pm 1,01 ab	3,87 ^{0,0334}
<i>M. anisopliae</i>	10,6 \pm 1,08	11,0 \pm 1,86	11,2 \pm 1,46	-
F ^P	-	-	-	
Esferulócitos				
Testemunha	3,9 \pm 1,22*	5,5 \pm 0,93*	4,0 \pm 0,66*	-
<i>M. anisopliae</i>	0,2 \pm 0,20	0,00	0,00	-
F ^P	8,73 ^{0,0085}	34,84 ^{0,0001}	36,17 ^{0,0001}	
Adipohemócitos				
Testemunha	1,8 \pm 0,45 b*	3,9 \pm 0,36 a*	3,1 \pm 0,61 ab*	4,56 ^{0,0197}
<i>M. anisopliae</i>	0,03 \pm 0,03*	0,00	0,00	-
F ^P	15,62 ^{0,0009}	114,15 ^{3,1958}	25,57 ^{0,0008}	
Oenocitóides				
Testemunha	0,7 \pm 0,17 b*	2,2 \pm 0,37* a	1,6 \pm 0,34 ab*	5,73 ^{0,0084}
<i>M. anisopliae</i>	0,03 \pm 0,33	0,00	0,00	-
F ^P	15,04 ^{0,0011}	33,79 ^{0,0001}	20,62 ^{0,0003}	

Médias (\pm DP) seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey HSD ($P > 0,05$).
 *Média do tratamento com fungo e testemunha diferem pela ANOVA (teste de Tukey), na coluna, para cada intervalo de avaliação.
¹Resultados não significativos pela ANOVA.

et al, 1998, Jalali & Salehi 2008). Assim, a concentração de 1×10^7 conídios/ml, em laboratório, mostrou-se capaz de interferir na defesa celular de *N. coxipoensis*.

Agradecimentos

Ao Dr. Jorge Braz Torres (UFRPE) pela ajuda nas análises estatísticas e apreciação do artigo e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho.

Referências

- Alves S B, Pereira R M (1998) Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos, p.39-52. In Alves S B (ed) Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Albuquerque A C, Pereira K C A, Cunha F M, Veiga A F S L, Athayde A C R, Lima E A L A (2005) Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). Neotrop Entomol 34: 585-592.
- Barduco M C, Gregório E A, Toledo L A (1988) Hemócitos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) no período larval, estudo morfológico e quantitativo. Rev Bras Biol 48: 925-932.
- Brayner F A, Araújo H R C, Cavalcanti M G S, Alves L C, Peixoto C A (2005) Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Micron 36: 359-367.
- Constantino R (2002) The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. J Appl Entomol 126: 355-365.
- Falleiros A M F, Bombonato M T S, Gregório E A (2003) Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the

- sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Braz Arch Biol Technol 46: 287-294.
- Fuguet R, Vey A (2004) Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp.: in vivo studies. J Invertebr Pathol 85: 152-167.
- Gunnarsson S G S (1988) Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus *Metarhizium anisopliae*: Cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. J Invertebr Pathol 46: 312-319.
- Gunnarsson S G S, Lackie A M (1985) Hemocytic aggregation in *Schistocerca gregaria* and *Periplaneta americana* as a response to injected substances of microbial origin. J Invertebr Pathol 46: 312-319.
- Gupta A P (1985) Cellular elements in hemolymph, p.401-451. In Kerkut G A, Gilbert L I (eds) Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology, Oxford, Pergamon Press, 625p .
- Han S S, Lee M H, Kim W K (1998) Hemocytic differentiation in hemopoietic organ of *Bombix mori* larvae. Zool Sci 15: 371-379.
- Hillyer J F, Christensen B M (2002) Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Histochem Cell Biol 117: 431-440.
- Jalali J, Salehi R (2008) The hemocyte types, differential and total count in *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) during post-embryonic development. Mun Entomol Zool 3: 199-216.
- Kurihara Y, Shimazu T, Wago H (1992) Classification of hemocytes in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) I. Phase microscopic study. Appl Entomol Zool 27: 225-235.
- Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M (2001) Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. Dev Biol 230: 243-257.
- Lavine M D, Strand M R (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol 32: 1295-1309.
- Ling E, Shirai K, Kanekatsu R, Kiguchi K (2003) Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining Histochem. Cell Biol 120: 505-511.
- Miranda C S, Vasconcellos A, Bandeira A G (2004) Termites in sugar cane in Northeast Brazil: ecology aspects and pest status. Neotrop Entomol 33: 237-241.
- Neves P J, Alves S B (1999) Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar,1832) (Isoptera: Termitidae) com *Metarhizium anisopliae*, *Beuveria bassiana* e imidacloprid. Sci Agric 56: 305-311.
- Pech L L, Strand M R (1996) Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. J Cell Sci 109: 2053-2060.
- Silva C, Dunphy G B, Rau M E (2000) Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. Dev Comp Immunol 24: 367-379.
- Sun J, Fuxa J R, Henderson G (2002) Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beuveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. J Invert Pathol 81: 78-85.
- Vilcinskas A, Matha V, Gijtz P (1997) Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. J Insect Physiol 43: 415-483.
- Vilmos P, Kurucz E (1998) Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. Immunol Lett 62: 59-66.
- Wang C, St Leger R J (2006) A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. PNAS 103: 6647-6652.
- Willott E, Thrower L W, Kanost M R (1994) Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. Eur J Cell Biol 65: 417-423.

Received 13/IX/07. Accepted 02/I/09.