

DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DOS HEMÓCITOS DO GAFANHOTO *TROPIDACRIS COLLARIS* (STOLL, 1813) (ORTHOPTERA: ROMALEIDAE)

A.A. Correia, A.V.S. Ferreira, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Histologia, Rua Dom Manoel de Medeiros s/nº, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: aliceli@recife.pe.gov.br

RESUMO

Em virtude da grande variedade na forma, função e número de hemócitos entre as diferentes espécies de insetos, a presente pesquisa teve o objetivo de descrever morfologicamente essas células presentes na hemolinfa do gafanhoto *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813), por meio da microscopia de luz, utilizando-se técnica de coloração pelo Giemsa. A descrição morfológica foi realizada no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os insetos foram obtidos da criação existente no Laboratório de Entomologia do Departamento de Biologia da UFRPE. Os resultados revelaram que a hemolinfa de *T. collaris* é constituída pelos seguintes hemócitos: prohemócitos, plasmócitos, coagulócitos e granulócitos.

PALAVRAS-CHAVE: Hemolinfa, hemócitos, gafanhoto, *Tropidacris collaris*.

ABSTRACT

MORPHOLOGIC DESCRIPTION OF THE HEMOCYTES OF THE TROPIDACRIS COLLARIS GRASSHOPPER (STOLL, 1813) (ORTHOPTERA: ROMALEIDAE). Due to the great variety in the form, function and hemocytes number among the different species of insects, the present research had was aimed at describing the morphology of these present in the hemolymph of the *Tropidacris collaris* grasshopper (Stoll, 1813), by means of light microscopy, with staining by Giemsa. The morphologic description was carried out in the Laboratory of Histology of the Department of Morphology and Animal Physiology of the Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE). The insects were obtained from the insect rearing facilities of the Laboratory of Entomology of the Department of Biology of UFRPE. The results revealed that the hemolymph of *T. collaris* is constituted by the following hemocytes: prohemocytes, plasmocytes, coagulocytes and granulocytes.

KEY WORDS: Hemolymph, hemocytes, grasshopper, *Tropidacris collaris*.

INTRODUÇÃO

A hemolinfa dos insetos está contida na cavidade geral do corpo (hemocele), onde banha vários órgãos internos e também entre os apêndices e as cavidades tubulares das veias das asas. Sendo o único fluido extracelular no corpo do inseto, é usualmente pouco colorido ou pode ter uma ligeira cor esverdeada ou amarelada dada por determinados pigmentos solúveis; constitui 15-75% do volume do inseto; a quantidade e composição variam com a espécie e sua condição fisiológica. Ela consiste de um componente líquido (plasma sangüíneo) e numerosas células sangüíneas livres flutuantes ou hemócitos (COMSTOCK, 1962; UVAROV, 1966; ROMOSER, 1973; MARANHÃO, 1976; RICHARDS & DAVIES, 1977, 1983; LARA, 1979; BORROR *et al.*, 1989; SNODGRASS, 1993; GALLO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002).

ROMOSER (1973) e BORROR *et al.* (1989) mencionaram as funções da hemolinfa sendo: lubrificante, transporte, armazenamento, meio hidráulico, proteção (fagocitose, encapsulação, desintoxicação, coagulação, cicatrizar lesões e fatores protetores não celulares) e formação de outros tecidos.

Quanto a composição química da hemolinfa, MUTTKOWSKI (1923), ROMOSER (1973) e SNODGRASS (1993) revelaram considerável variação, sendo alguns dos maiores constituintes: água, sais inorgânicos, materiais nitrogenados, ácido orgânicos, carboidratos, lipídios, aminoácidos, proteínas, pigmentos, gases e hemócitos.

Embora uma grande variedade de funções tenha sido atribuída aos hemócitos, somente quatro são bem documentadas e geralmente aceitas; são elas: (1) fagocitose de pequenas partículas, (2) encapsulação de grandes objetos estranhos, (3) coagulação do sangue

por aglutinação celular e/ou por contribuição da precipitação do plasma, e (4) armazenamento e distribuição de materiais nutritivos (LITTLE, 1972; ROCKSTEIN, 1974; MARANHÃO, 1976; BORROR *et al.*, 1989; INQUE *et al.*, 2001; RUSSO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2002).

Provavelmente, o mais conhecido e mais usado sistema de classificação dos hemócitos é o que foi desenvolvido por JONES (1962), o qual está baseado no estabelecimento de que há três tipos celulares bem definidos na maioria dos insetos (prohemócitos ou proleucócitos, plasmatócitos ou plasmócitos e hemócitos granulares ou granulócitos), um ou mais de quatro outros tipos em muitos insetos (cistócitos ou coagulócitos, células esféricas, adipohemócitos e oenocitóides) e dois tipos extremamente especializados em alguns poucos insetos (podócitos e células vermiformes).

Segundo ROCKSTEIN (1974), uma visão mais moderada, considera 3 ou 4 categorias na hemolinfa de orthopteróide, mas não há consenso nos tipos de células. Muitos autores não reconhecem oenocitóides na hemolinfa de orthopteróide, porém HOFFMANN (1970) considerou que eles ocorrem em *Locusta*, juntamente com granulócitos, plasmatócitos e coagulócitos.

Dentre as espécies de gafanhoto destaca-se o *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae), conhecido vulgarmente como tucurão. Trata-se de uma espécie de importância econômica, principalmente, porque causa danos na mangueira (*Mangifera indica*) e ao coqueiro (*Coccus nucifera*) (CHAGAS *et al.*, 1995). Segundo SANTOS, (1982) e DURATON *et al.* (1987) é atribuído ainda a essa espécie, ataques as folhas e frutos do abacateiro, bananeira, mandioca, algodoeiro, limoeiro, vinha, seringueira e às vezes da cana-de-açúcar e arroz.

Existem várias pesquisas sobre a biologia e anatomia macroscópica dos gafanhotos (UVAROV, 1966; MARANHÃO, 1976; BUZZI & MIYAZAKI, 1999; GALLO *et al.*, 2002); no entanto, pouco se conhece sobre sua anatomia microscópica, principalmente, com relação aos hemócitos. Assim, devido a grande variedade na forma, função e número de hemócitos entre as diferentes espécies de insetos, a presente pesquisa teve o objetivo de descrever morfologicamente os hemócitos presentes na hemolinfa de *T. collaris*, por meio da microscopia de luz, utilizando-se técnica de coloração especial, visando obter subsídios para um melhor entendimento da sua fisiologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados adultos machos de *T. collaris*, com 14 dias após a última ecdise, procedentes da criação existente no Laboratório de Entomologia do Departamento de Biologia da UFRPE. Esses insetos eram mantidos a temperatura ambiente, em gaiolas teladas, contendo recipiente com água e alimentados com folhas de mangueira que eram trocadas a cada 2 dias. Para coleta da hemolinfa utilizou-se dez insetos, onde se realizou uma incisão no trocanter do segundo par de patas, colhendo-se gotículas de hemolinfa diretamente sobre lâminas secas e previamente limpas, segundo uma modificação da metodologia descrita por HUSTERT (1999). Em seguida procedeu-se o esfregão, espalhando assim a hemolinfa em camadas finas (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA 1983). Os esfregaços foram mantidos a temperatura ambiente por 20 a 30 min, para adesão dos hemócitos à lâmina. Posteriormente, foram fixados em metanol por cerca de 5 min, sendo submetidas posteriormente à técnica de coloração pela solução de Giemsa (3 gotas em 1 mL de água destilada), permanecendo nesse corante por 3 min (SILVA *et al.*, 2000). A análise morfológica foi realizada utilizando-se microscópio de luz, da marca Olympus BX-49, e fotografados em fotomicroscópio Olympus BX-51.

mento de Biologia da UFRPE. Esses insetos eram mantidos a temperatura ambiente, em gaiolas teladas, contendo recipiente com água e alimentados com folhas de mangueira que eram trocadas a cada 2 dias. Para coleta da hemolinfa utilizou-se dez insetos, onde se realizou uma incisão no trocanter do segundo par de patas, colhendo-se gotículas de hemolinfa diretamente sobre lâminas secas e previamente limpas, segundo uma modificação da metodologia descrita por HUSTERT (1999). Em seguida procedeu-se o esfregão, espalhando assim a hemolinfa em camadas finas (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA 1983). Os esfregaços foram mantidos a temperatura ambiente por 20 a 30 min, para adesão dos hemócitos à lâmina. Posteriormente, foram fixados em metanol por cerca de 5 min, sendo submetidas posteriormente à técnica de coloração pela solução de Giemsa (3 gotas em 1 mL de água destilada), permanecendo nesse corante por 3 min (SILVA *et al.*, 2000). A análise morfológica foi realizada utilizando-se microscópio de luz, da marca Olympus BX-49, e fotografados em fotomicroscópio Olympus BX-51.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos esfregaços da hemolinfa de *T. collaris* observou-se uma grande quantidade de hemócitos com forma e tamanho variados (Fig. 1A). No entanto, de um modo geral as células mais observadas em todos os esfregaços foram os plasmócitos que apresentaram morfologia variando de esférica a oval, com prolongamentos citoplasmáticos nesta última forma. Essas células apresentam citoplasma hialino com núcleo central em número que varia de um a dois (Fig. 1B).

A coloração pelo Giemsa identificou no esfregaço mais três tipos diferentes de hemócitos: prohemócitos, coagulócitos e granulócitos. Os prohemócitos apresentam aspecto esférico com núcleo bastante volumoso, reduzindo o citoplasma a uma pequena faixa periférica (Fig. 1C). Essas células foram os únicos tipos de hemócitos que apresentaram figuras sugestivas de mitose (Fig. 2D).

Os coagulócitos caracterizam-se por apresentar no seu citoplasma vários vacúolos de tamanhos diferentes, os quais aparecem freqüentemente próximos à superfície da célula, além de apresentar núcleo central (Fig. 2E).

Os granulócitos caracterizam-se por apresentarem numerosos grânulos citoplasmáticos e núcleo central (Fig. 2F).

No que se refere aos hemócitos, WHEELER *et al.* (1993), SODERHALL & CERENIUS (1998) e WILSON *et al.* (1999) relataram que os insetos não possuem o sistema imunológico sofisticados dos vertebrados. Contudo eles são particularmente resistentes aos seus inimigos naturais. Para se defender, eles desenvolvem,

uma série de mecanismos tais como: síntese de peptídeos antimicrobianos, inibidores de proteases, coagulação da hemolinfa, defesas celulares etc.

As defesas celulares são executadas pelos hemócitos (DUNN, 1986). Essas células circulam livremente na hemolinfa, mas, após a invasão de bactérias, fungos, vírus ou protozoários rapidamente migram para o local da infecção e, eventualmente fagocitam e destroem os invasores (SILVA *et al.*, 2000; RUSSO *et al.*, 2001).

Os resultados mostraram que os hemócitos mais observados na hemolinfa de adultos *T. collaris* foram os plasmócitos. Segundo SILVA *et al.* (2000), RUSSO *et al.* (2001) e GIULIANINI *et al.* (2003) essas células apresentam diâmetro variando entre 7,1µm, e 9,7µm, estando envolvidas no processo de fagocitose, onde após receberem sinais da presença de bactérias ou outro microorganismo, estendem protrusões finas e rígidas chamadas filopódias, as quais exercem um papel importante na fagocitose. Esses mesmos autores relatam ainda que essas células, em sua maioria, apresentam-se mononucleadas, porém ocasionalmente podem ser binucleadas, o que está de acordo com as nossas descrições para esse tipo de hemócito.

Os prohemócitos apresentam diâmetro de 6,9 µm, caracterizando-se pelo tamanho volumoso do núcleo, o

qual chega a atingir cerca de 4 mm de diâmetro (GIULIANINI *et al.*, 2003). Segundo vários autores essas células estão envolvidas no processo de hematopoiese, pois se dividem originando os demais tipos de hemócitos (CHIANG *et al.*, 1988; FENOGLIO *et al.*, 1993; RUSSO *et al.*, 1994; LAVINE & STRAND 2002; SILVA *et al.*, 2002).

Os coagulócitos encontrados em *T. collaris*, apresentaram características similares às observadas por GIULIANINI *et al.* (2003). Devemos mencionar ainda que GILLESPIE *et al.*, (2000) relataram que em *Schistocerca gregária*, inoculado com fungo *Metarhizium anisopliae*, foram identificados três tipos de hemócitos: plasmócitos, granulócitos e coagulócitos.

Os granulócitos apresentam diâmetro variando entre 7,9µm, a 12,9µm, sendo bastante numerosas em algumas espécies de insetos, porém em outras são pouco frequentes (ROCKSTEIN, 1974; GIULIANINI *et al.*, 2003). GILLESPIE *et al.* (2000) e TOGO *et al.* (2000) citaram que essas células, juntamente com os plasmócitos são os tipos mais frequentemente observados nos processos de defesa tais como: fagocitose, encapsulação e formação de nódulos. GALLO *et al.* (2002) relataram ainda que os granulócitos ou são células em degeneração ou são trofócitos, desempenhando assim função no transporte de materiais nutritivos.

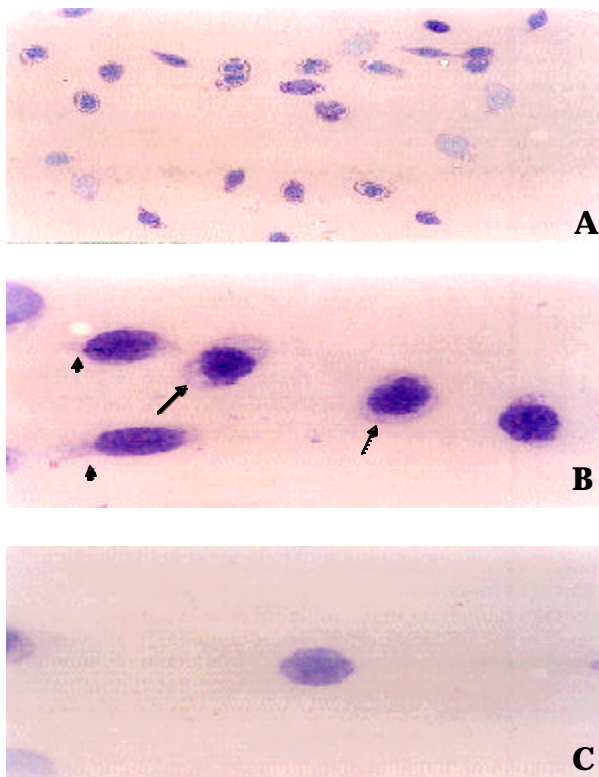


Fig. 1 - Fotomicrografias dos hemócitos de *T. collaris*: A. observar morfologia variada, Aumento ± 428X. B. Plasmócitos (setas), algumas com prolongamentos citoplasmáticos (ponta de setas). Aumento ± 1071X. C. Prohemócito. Aumento ± 1071X.

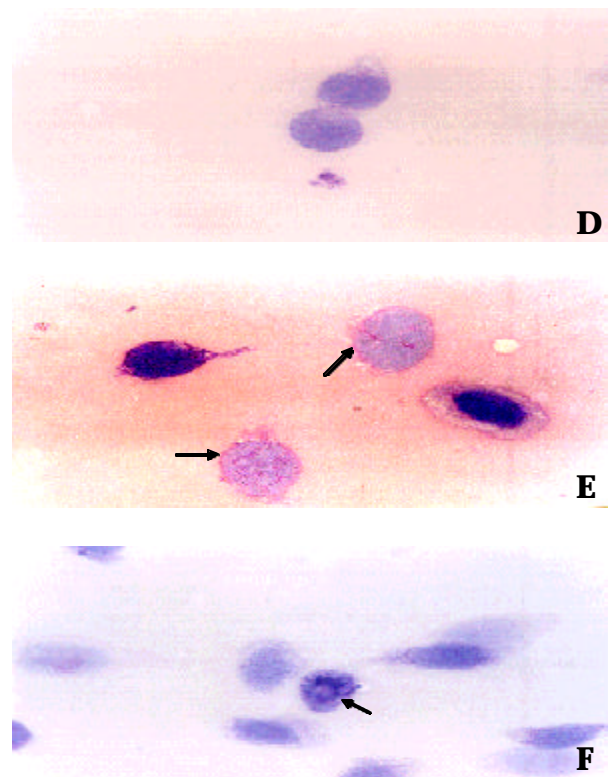


Fig 2 - D. Prohemócito em mitose. Aumento ± 1071X. E. Coagulócitos (setas). Aumento ± 1071X. F. Granulócito (seta). Aumento ± 1071X.

CONCLUSÕES

A hemolinfa de *T. collaris* é constituída pelos seguintes hemócitos: prohemócitos, plasmócitos, coagulócitos e granulócitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORROR, D.J.; TRIPLEHORN, C.A.; JOHNSON, N.F. *An introduction to the study of insects*. 6. ed. New York: Harcodrt Brace Jobanovich Colleg Publishers, 1989. p.47-48, 214-215.
- BUZZI, Z.J. & MIYAZAKI, R.D. *Entomologia didática*. 3. ed. Curitiba: Editora da UFPR, 1999. p.61-64.
- CHAGAS, M.C.M.; MOREIRA, M.A.B.; BARRETO, M.F.P. Biological aspects of *Schistocerca pallens*, *Stiphra robusta* and *Tropidacris collaris* grasshoppers species at Rio Grande do Norte state, Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL FRUITS, 1., 1995, Vitória, ES. *Resumos*. Vitória: 1995. p.37.
- CHIANG, A.S.; GUPTA, A.P.; HAN, S.S. Arthropod immune system: I. Comparative light and electron microscopy accounts of immunocytes and other hemocytes of *Blattellagermanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Morphol.*, v.198, p.257-267, 1988.
- COMSTOCK, J.H. *An introduction to entomology*. 9. ed. New York: Comstock Publishing Associates, 1962. p.121-123.
- DUNN, P.E. Biochemical aspects of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.*, v.31, p.321-339, 1986.
- DURATON, J.F.; LAUNOIS, M.; LAUNOIS-LUONG, M.H.; LECOQ, M.J.F. *Guia prático de luta contra os gafanhotos devastadores no Brasil*. 1. ed. Roma: Fao-Cirad-Prifas, 1987. p.7-43.
- FENOGLIO, C.; BERNARDINI, P.; GERVASO, M.V. Cytochemical characterization of the hemocytes of *Leucophaea moderate* (Dyctyoptera-Blaberoidea). *J. Morphol.*, v.218, p.115-126, 1993.
- GALLO, D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMATO, C. *Entomologia agrícola*. 10. ed. São Paulo: Ceres, 2002. p.140-141.
- GILLESPIE, J.P., BURNETT, C.; CHARNLEY, A.K. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *J. Insect Physiol.*, n.46, p.429-437, 2000.
- GIULIANINI, P.G.; BERTOLO, F.; BATTISTELLA, S.; AMIRANTE, G.A. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis. *Tissue & Cell*, n.35, p.243-251, 2003.
- HOFFMANN, J.A. Régulations endocrines de la production et de la différenciation des hémocytes chez un insecte orthoptère: *Locusta migratoria migratoroides*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.15, p.198-219, 1970.
- HUSPERT, R. Accessory hemolymph pump in the mesothoracic legs of locusts, (*Schistocerca gregaria* forskal) (Orthoptera, Acrididae). *In. J. Insect Morphol.*, v.28, p.91-96, 1999.
- INQUE, N.; HANADA, K.; TSUJI, N.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, v.38, n.4, p.514-519, 2001.
- JONES, J.C. Current concepts concerning insect haemocytes. *Am. Zool.*, v.2, p.209-246, 1962.
- JUNQUEIRA, L.C.U. & JUNQUEIRA, L.M.M.S. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. 1. ed. São Paulo: Editora Santos, 1983, p.85-88.
- KAAYA, G.P.; RATCLIFFE, N.A.; ALEMU, P. Cellular and humoral defenses of glossina: reactions against bacteria, trypanosomes and experimental implants. *J. Méd. Entomol.*, v.23, p.30-43, 1986.
- LARA, F.M. *Princípios de entomologia*. 2. ed. São Paulo: Livroceres, 1979. p.79-87.
- LAVINE, M.D. & STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, n.32, p.1295-1309, 2002.
- LITTLE, V.A. *General and applied entomology*. 3. ed. New York: Harper & Row, 1972. p.49-50.
- MARANHÃO, Z.C. *Entomologia geral*. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1976. p.173-175.
- MUTTKOWSKI, R.A. Studies on the blood of insects. I. The composition of the blood. *Bull. Brooklyn Entomol. Soc.*, v.18, p.127-136, 1923.
- PRICE, C.D. & RATCLIFFE, N.A. A reappraisal of insect haemocyte classification by the examination of blood from fifteen insect orders. *Z. Zellforsch.*, v.147, p.537-549, 1974.
- RICHARDS, O.W. & DAVIES, R.G. *Entomology*. 10. ed. London: John Wiley, 1977. v.1, p.234-247.
- RICHARDS, O.W. & DAVIES, R.G. *Tratado de entomologia imms*. 10. ed. London: Ômega, 1983. p.310-318.
- ROCKSTEIN, M. *The Physiology of Insecta*. 2. ed. New York: Academic Press, 1974. p.201-254.
- ROMOSER, W.S. *The science of entomology*. New York: Macmillan Publishing, 1973. p.72-85.
- RUSO, J.; ALLO, M.R.; NENON, J.P.; BREHELIN, M. The hemocytes of the mealybugs *Phenacoccus manihoti* and *Planococcus citri* (Insecta: Homoptera) and their role in capsule formation. *Can. J. Zool.*, v.72, p.252-258, 1994.
- RUSO, J.; BREHELIN, M.; CARTON, Y. Hemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J. Insect Physiol.*, v.47, p.167-172, 2001.
- SANTOS, E. *Os insetos, vidas e costumes*. Belo Horizonte: Itatiaia, 1982. t.1. p.47-49.
- SILVA, J.B.; ALBUQUERQUE, C.M.R.; ARAÚJO, E.C.; PEIXOTO, C.A.; HURD, H. Immune Defense Mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida albicans* Infection. *J. Invert. Pathol.*, v.76, p.257-262, 2000.
- SILVA, C.; DUNPHY, G.B.; RAU, M.E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Dev. Comp. Immunol.*, v.24, p.367-379, 2000.
- SILVA, J.E.B.; BOLELI, I.C.; SIMÕES, Z.L.P. Hemocytes types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. *Braz. J. Biol.*, v.62, n.4A, p.689-699, 2002.
- SNODGRASS, R. E. *Principles of insect morphology*. New York: McGraw-Hill, 1993. p.389-421.
- SÖDERHÄLL, K. & CERENIUS, L. Role to the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, v.10, n.1, p.23-28, 1998.

- TOGO, S.; NAGANUMA, F.; ARAKAWA, K.; YOKOO, S. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.*, n.46, p.1129-1135, 2000.
- UVAROV, S.B. *Grasshoppers and locusts*. London: Cambridge University Press, 1966. v.1, p.105-117.
- WHEELER, M.B.; STUART, G.; HAPNER, K.D. Agglutinin-mediated opsonization of fungal blastospores in *Melanoplus differentialis* (Insect). *J. Insect Physiol.*, v.39, n.6, p.477-483, 1993.
- WILSON, R.; CHEN, C.; RATCLIFFE, N.A. Innate immunity in insects – the role of multiple endogenous serum lectin in the recognition of foreign invaders in the cockroach *Blaberus discoidalis*. *J. Immunol.*, v.162, p.1590-1596, 1999

Recebido em 28/2/05

Aceito em 30/3/05