

Estudo preliminar do desenvolvimento embrionário *in vitro* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

André Morando*
Jane Mary Lafayette Neves Gelinski**

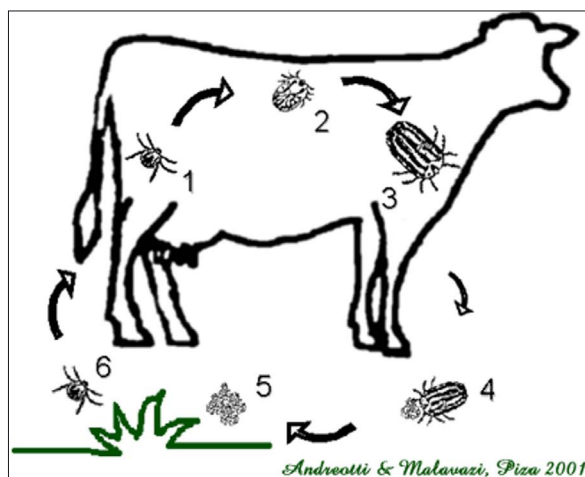
Resumo

Neste estudo fez-se a observação preliminar do desenvolvimento embrionário *in vitro* do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A eclosão dos ovos em larvas ocorreu a 28°C no vigésimo oitavo dia após oviposição. Após postura, as fêmeas sobreviveram por cerca de 36 horas.

Palavras-chave: Desenvolvimento embrionário. Carrapato. *In vitro*.

1 INTRODUÇÃO

As parasitoses ocupam lugar de destaque entre as patologias bovinas, pois provocam perdas difíceis de serem mensuradas. Entre as principais consequências, citam-se: emagrecimento e retardo no crescimento, queda na produção de leite e carne, mortalidade, redução da natalidade e doenças causadas por protozoários, como *Babesia bovis* e *Babesia bigemia* ou bactérias com a riquetsia *Anaplasma marginale*, que causa a “[...] tristeza parasitaria bovina.” (RAMOS et al., 2004).



Desenho 1: Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Fonte: Andreotti (2002).

Legenda: Fase parasitária: 1 = larva infectante realizando a fixação no bovino; 2 = ninfa; 3 = teleóquina em estágio final de ingurgitamento. Fase de vida livre: 4 = teleóquina logo após desprendimento, em período de postura no solo; 5 = ovos, no solo, em período de incubação; 6 = larva, no solo, em período de incubação.

* Bacharel em Ciências Biológicas; professor secundarista.

** Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo; Mestre em Genética pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul; professora da Universidade do Oeste de Santa Catarina.

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixoidae) é um dos principais causadores de perdas na pecuária bovina. Anteriormente denominado *Boophilus microplus* passou a ser um subgênero do gênero *Rhipicephalus* (CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2007).

Na tentativa de minimizar os problemas na pecuária bovina, muito se pesquisa sobre medidas preventivas e auxiliares no controle do parasita, sendo de fundamental importância o conhecimento do ciclo evolutivo do carrapato (Desenho 1), da epidemiologia, do manejo das pastagens e da eficácia dos carrapaticidas (SOUZA et al., 1993; SANTOS et al., 2009).

A fase de vida parasitária inicia-se quando a larva infestante se instala no hospedeiro passando a ser larva parasitária e se transformando em metalarva, sendo necessários cinco dias, em média, para esse período, podendo variar de três a oito dias. Conforme Gozales (1974), são necessárias várias transformações para que o parasito chegue ao estágio adulto; os respectivos períodos de duração compreendem: de metalarva a ninfa (5 a 10 dias, em média 8); de ninfa a metaninfa (9 a 23 dias, 13 em média). Nessa fase, já há diferenciação entre os sexos, e a transformação de metaninfa para neandro necessita de 18 a 28 dias, com 14 dias em média, passando a gonandro em 2 dias, permanecendo no animal por mais de 38 dias, transformando-se de metaninfa para neógena em torno de 14 a 23 dias, média de 17 dias, passando a partenógena em três dias e a teleógena em dois dias, o início da queda das teleóginas ocorre no 19º dia da infestação; em média, entre o 22º e 23º dia.

Na fase de vida livre, a fêmea ingurgitada passa por um período de pré-postura de três dias e morre após a postura; em temperaturas ao redor de 28°C e alta umidade relativa (85%), a postura e a eclosão ocorrem em aproximadamente 18 dias; larvas recém-eclodidas migram para as pontas da vegetação, onde podem localizar o hospedeiro pelo odor ou vibrações. No hospedeiro, as larvas fixam-se em regiões corporais propícias ao seu desenvolvimento, como posterior da coxa, perineal, perianal e perivulvar; após sete dias de sua fixação ocorre a muda para ninfas, e estas mudam para adultos com marcado dimorfismo sexual em aproximadamente oito dias. A fêmea após o acasalamento começa a alimentação até o ingurgitamento total, que propicia sua queda ao solo, enquanto que o macho permanece no bovino à procura de novas fêmeas (VERÍSSIMO, 1991).

De forma mais simples, o ciclo de *R. microplus* para o Brasil-Central é descrito por Furlong (1993). Na fase de vida livre são necessários em torno de três dias para a pré-postura; de três a seis semanas para a postura; de vinte e dois a trinta dias para a eclosão das larvas e de dois a três dias para o fortalecimento de suas cutículas, transformando-as em larvas infestantes. Ainda, segundo Furlong (1993), a cada postura uma fêmea produz de 2.000 a 3.000 ovos, os quais, ao eclodirem, darão origem a larvas que terão período médio de 18 a 26 dias para a fase parasitária, para a fixação, alimentação, troca de cutícula, fase adulta e acasalamento, assim como para a alimentação, ingurgitamento e queda das fêmeas; os machos permanecem mais tempo sobre o bovino e se acasalam com outras fêmeas. Estudos *in vitro* com o parasita são realizados com vários propósitos, principalmente na produção de antígenos e imunógenos ou para a avaliação de carrapaticidas. Bittencourt et al. (1997) e Bittencourt, Mascarenhas e Faccini (1999) utilizaram fêmeas ingurgitadas do parasita da eficácia de fungos entomopatogênicos. Kessler et al. (2000) utilizaram células de linha de tecidos do *R. microplus* para a obtenção de substratos para cultivo *in vitro* de hemoparasitas como fonte alternativa de produção de antígenos e imunógenos. Atualmente, existem 13 linhagens estabelecidas de células de carrapatos para estudos de propagação do parasita (BELL-SAKYI apud BASTOS et al., 2007).

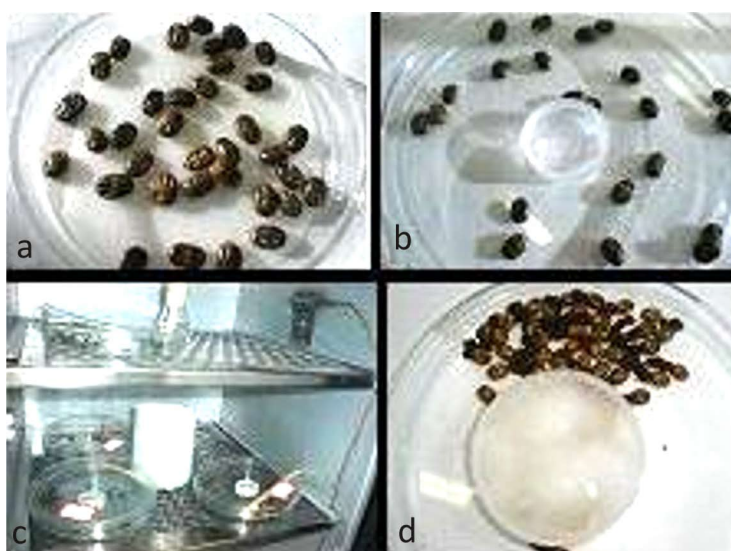
No presente, o desenvolvimento embrionário do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi observado em condições laboratoriais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta inicial de teleóginas foi realizada em propriedade rural localizada no município de Iomerê, SC, no período de maio a agosto de 2006. Foram realizadas coletas aleatórias de 90 a 100 teleóginas em bovinos. Os parasitas foram acondicionados em frascos livres de resíduos, com tampas que permitiam a aeração, e mantidos em temperatura ambiente. Foram transportados ao laboratório, onde imediatamente foram selecionados e separados em grupos de 20 teleóginas de igual tamanho.

Foram formados três grupos de fêmeas do carrapato em relação ao peso. No primeiro grupo, foram colocadas fêmeas com peso superior a 300 mg, no segundo grupo, fêmeas com 100-200 mg e, no terceiro grupo, fêmeas com peso inferior a 100 mg. Cada grupo recebeu de 25 a 35 teleóginas viáveis (excluídas as mortas e as que se apresentavam inertes). Os grupos foram acondicionados em placas de Petri de vidro. As teleóginas foram mantidas em incubadora à temperatura constante de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para manutenção da umidade no ambiente foram colocados pequenos recipientes com água destilada dentro de cada placa de Petri e outros recipientes maiores distribuídos pela estufa. A umidade relativa média foi de $80\% \pm 5\%$. Cada placa foi mantida semiaberta para aeração.

Após a oviposição, a massa de ovos foi distribuída em tubos de ensaio. Alguns tubos foram colocados dentro de placas de Petri contendo algodão umedecido no fundo. Outros foram colocados verticalmente em estantes apropriadas e tampados com algodão para que após a eclosão as larvas não saíssem do tubo. As placas foram parcialmente tampadas. A temperatura para a incubação foi mantida a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Fotografia 1).

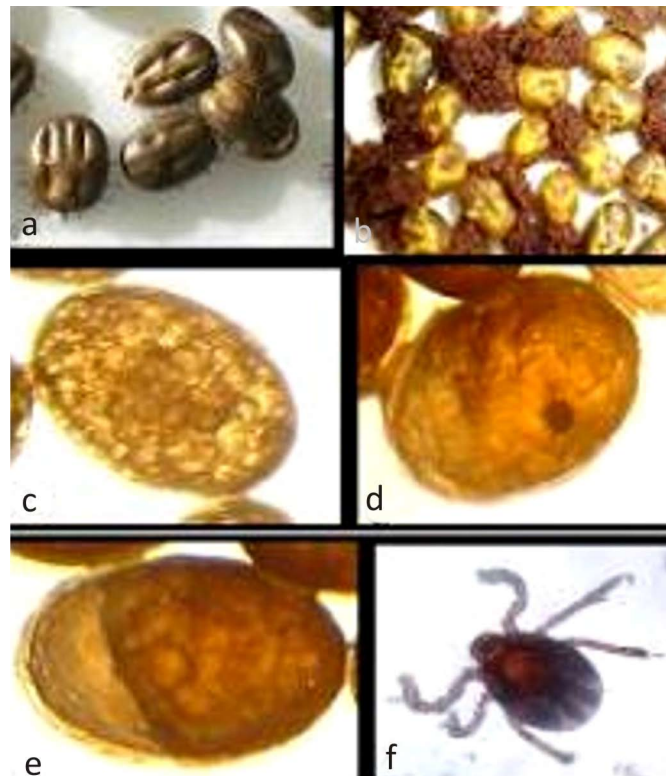


Fotografia 1: Teleóginas acondicionadas em placas de Petri a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $80\% \pm 5\%$ (a, b, c, d)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As teleóginas foram observadas diariamente e constatou-se que, no quarto dia após a formação dos grupos e subsequente acondicionamento na estufa, elas fizeram a oviposição. As fêmeas mais pesadas, ou seja, acima de 300 mg, obtiveram a maior massa de ovos. Em contrapartida, fêmeas com peso menor que 100 mg tiveram desempenho reduzido ou nenhum em relação à oviposição. Verificou-se que as teleóginas após a oviposição apresentavam coloração marrom-escura, com rajadas de amarelo na parte posterior do corpo, diferentemente da fase de pré-postura, com coloração cinza-escuro e brilho intenso. Cerca de 90% das teleóginas mantiveram-se vivas por um período aproximado de 36 horas após a oviposição. Essas observações são semelhantes às descritas por Veríssimo (1991), embora o autor faça referência a condições de campo: "Na fase de vida livre, a fêmea ingurgitada apresenta primeiro um período de pré-postura de três dias e morre após a postura." Entende-se, portanto, que as fêmeas morrem rapidamente após a oviposição. No presente trabalho, nas condições de laboratório tal qual se observou, a maioria das fêmeas permaneceu viva por 36 horas após a oviposição. A eclosão dos ovos somente aconteceu com a massa de ovos acondicionada em tubos abertos e com umidade constante.

O percentual de eclosão foi de 85%. Já a massa de ovos acondicionada em tubos fechados e sem umidade ficou desidratada e murchou, não havendo eclosão. As larvas resultantes mostraram-se ativas, com comprimento médio de 1,5 mm, de coloração marrom-avermelhado e apresentando três pares de patas (Fotografia 2).



Fotografia 2: Desenvolvimento embrionário *in vitro* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Legenda: (a) Teleóginas ingurgitadas; (b) Teleóginas com massa de ovos após oviposição; (c,d,e) desenvolvimento embrionário, 1ª, 2ª e 3ª semana respectivamente; (f) Larva com 3 pares de patas.

4 CONCLUSÃO

Em condições laboratoriais, o desenvolvimento embrionário de *Rhipicephalus microplus* pode ser observado desde a eclosão dos ovos até a fase de larvas quando se apresenta com três pares de patas. As teleóginas sobrevivem *in vitro* por 36 horas após a oviposição.

Preliminary study of in vitro embryonic development of Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Abstract

In this study was observed the in vitro embryonic development of tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Twenty and eight days at 28°C were necessary to become eggs in larvae at 28°C. After ovipositing the female adult survived for about thirty and six hours.

Keywords: Embrionic development. Tick. In vitro.

REFERÊNCIAS

ANDREOTTI, R. Caracterização de inibidores de serinoproteases (BmTIs) presentes em larvas de carrapatos *Boophilus microplus* e o seu efeito no controle da infestação parasitária em bovinos. 2002. 98 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)–Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.

BASTOS, C. V. et al. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, 2007.

BITTENCOURT, V. R. E. P. et al. Avaliação da eficácia *in vitro* de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, p. 49-52, 1997.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. Mecanismo de penetração do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus*, em condições experimentais. **Revista Ciência Rural**, v. 29, p. 351-354, 1999.

CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH (CFSPH). **Rhipicephalus (Boophilus) microplus**. 2007. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/boophilus_microplus.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2009.

FURLONG, J. **Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1993. (Boletim Técnico, n. 8).

KESSLER, R. K. **Cultivo in vitro de tecidos do carrapato Boophilus microplus**. Brasília, DF: Embrapa Gado de corte. Projeto de pesquisa. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/projetos/subprojetos/06_0_97_180_02.html>. Acesso em: 22 abr. 2009.

RAMOS, C. I. et al. **Parasitoses de bovinos e ovinos: epidemiologia e controle em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2004. (Boletim Técnico).

SANTOS, T. R. B. et al. Abordagem sobre o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 29, p. 65-70, 2009.

SOUZA, A. P. et al. Poder infestante das larvas de *Boophilus microplus*, em condições naturais dos campos de Lages, SC, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 1993.

VERÍSSIMO, C. J. **Resistência e suscetibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato Boophilus microplus**. 1991. 170 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal)–Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1991.

