

Efeito da opsonização na taxa de fagocitose dos hemócitos do caranguejo estuarino *Neohelice granulata* (Brachiura; Decapoda)

Janaíse Mesquita Bueno, Luciano de Mello Silva, Pablo Elías Martínez

Introdução

A fagocitose é o processo pelo qual a célula captura toda e qualquer substância estranha ao organismo. Este processo é amplamente facilitado pela opsonização gerada pela presença de proteínas semelhantes às proteínas do sistema do complemento (Iwanaga & Lee, 2005). Em vertebrados o sistema do complemento é composto por proteínas zimogênicas, que se ativam em uma cascata proteolítica na presença de patógenos e sua principal função é opsonizá-los e formar o complexo de ataque a membrana. Em crustáceos, as proteínas de semelhante atividade, como as aglutininas estudadas em *Macrobrachium rosenbergii* estão no plasma da hemolinfa, são solúveis e participam da primeira linha de defesa do organismo num processo de opsonização e fagocitose (Raman *et al.*, 2008). O presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a concentração de soro e tempo de opsonização mais adequados para se obter uma maior taxa de fagocitose em hemócitos de *N. granulata* com o objetivo de aprimorar o protocolo de avaliação das taxas de fagocitose em lâminas.

Metodologia

A Hemolinfa do caranguejo *N. granulata* foi coletada com seringa de 10mL e agulha de insulina numa proporção de 9 partes de anticoagulante Soderhal & Smith (1983) para 1 parte de hemolinfa. A hemolinfa foi lavada por centrifugação a 800g por 5min e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio de cultura M199. Uma alíquota de 45µL foi coletada desta amostra e utilizada para contagem de hemócitos totais e teste de viabilidade por exclusão do Tripán Blue, sendo considerado propício ao teste de fagocitose a amostra que apresentou viabilidade que 85%. Os hemócitos contados foram diluídos em solução fisiológica de crustáceo para ajuste a 1×10^5 células por mL e então incubados por uma hora num volume de 0,5mL em lâminas citológicas previamente limpas em álcool etílico 100%. As lâminas foram então lavadas três vezes com solução fisiológica e incubadas nos tempos de 20, 40 e 60 min com 0,5mL de leveduras *Saccharomyces cerevisia* a 1×10^7 células.mL⁻¹ e coradas com Vermelho Congo (0,8% p/v) previamente autoclavadas por 15min a 121°C e lavadas por centrifugação a 1300g/5min até que o sobrenadante ficasse translúcido. Antes da incubação nas lâminas contendo os hemócitos, estas leveduras foram opsonizadas em 3 tubos contendo 100µl, 300µl e 500µl

de soro (obtido através da coleta de hemolinfa sem anticoagulante deixada em temperatura ambiente por 1 hora). Os dados foram analisados quanto a variancia dos tratamentos pelo software Statistica 8.0.

Resultados e Discussão

As lâminas que foram incubadas com as leveduras opsonizadas com 100 μ L de soro apresentaram significativamente ($p < 0,05$) o melhor tempo de opsonização em 60 min., atingindo uma taxa de 60% de fagocitose. Esta taxa foi maior que as taxas obtidas nos tempos de 20min (taxa foi de 20%) e em 40min (30%), já nas lâminas com leveduras opsonizadas com 300 μ L de soro em 20min de opsonização observou-se uma taxa de 20% de fagocitose, em 40min 40% e na opsonização por 60min a taxa atingiu 35% de fagocitose. Da concentração de 500 μ L, observou-se maior taxa de fagocitose na opsonização por 60min, que chegou a 45% pois em 40min a taxa foi de 10% e em 20min observou-se 10% de fagocitose. As menores taxas de fagocitose obtidas nas concentrações mais elevadas de soro podem estar relacionadas com a destruição da célula pela atividade tipo complemento das moléculas presentes no soro.

Conclusão

Após a análise dos resultados, é possível afirmar que a concentração e o tempo de opsonização adequados e que aumentam a taxa de fagocitose em proporções expressivas são de 100 μ L de soro e 60min de opsonização ($p < 0,05$), quando comparados às lâminas do controle, o qual foi realizado sem a adição de soro nas leveduras, pois nesse a taxa de fagocitose foi de 15%. Assim, tal concentração de soro pode ser utilizada em testes de fagocitose em lâminas para facilitação da fagocitose e otimização dos resultados.

Referencias

RAMAN, T.; ARUMUGAM, M. & MULLAINADHAN, P. **Agglutinin-mediated phagocytosis-associated generation of superoxide anion and nitric oxide by the hemocytes of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii***. Fish & Shellfish Immunology. 2008. 24, 337-345p.

IWANAGA, S & LEE, B. L. **Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate Animals**. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2005. 38 (2), 128-150p.

SÖDERHÄLL, K., SMITH, V.J. **Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenus* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution.** *Developmental Comportamental Immunology.* 1983. 7, 229–239.

