LOURIVALDO DOS SANTOS PEREIRA

**RESPOSTA IMUNE DO CARRAPATO
BOVINO *BOOPHILUS MICROPLUS*:
INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
PELOS HEMÓCITOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de MESTRE em Biologia da
Relação Patógeno Hospedeiro

SÃO PAULO

2000

LOURIVALDO DOS SANTOS PEREIRA

**Resposta imune do carrapato bovino *Boophilus microplus*: Investigação da
produção de espécies reativas de oxigênio pelos hemócitos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
MESTRE

Área de concentração:

Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Sirlei Daffre

SÃO PAULO

2000

A Deus,
Aos meus pais, Jesuino e Luzia,
Aos meus irmãos, Jussinéia e Mauricio (*in memorian*),
À minha esposa, Diva,
Aos meus filhos, Vitor e Amanda

que nesta ordem entraram em minha
vida dando-lhe sentido e razão

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial à Sirlei pelo acolhimento em seu laboratório e, principalmente, por sua amizade durante a realização deste trabalho. Sou-lhe grato pela enorme contribuição para meu crescimento acadêmico-científico e humano. Obrigado PROFESSORA AMIGA.

À minha esposa, DIVA, que sempre me ajudou a tomar decisões e, mais que isso, me apoiou e incentivou. Teve muita paciência (as vezes nem tanta) e entendeu (ou pelo menos tentou entender) o porquê de tantas horas no laboratório. Valeu AMOR. Quanto ao VITOR e à AMANDA, um dia explico para eles.

Um obrigado especial aos meus Pais e Irmãos por todo incentivo e apoio durante toda minha vida. As lições de vida que aprendi na família foram mais que suficientes para me tornar mestre (só não sei se consegui). Obrigado

A todo o "staff" do Laboratório de Moscas-das-Frutas (IB-USP) no período de fev/85 a fev/90. Foram cinco anos inesquecíveis da minha vida: vocês, na verdade, têm grande responsabilidade (ou será culpa?) por minha vida acadêmica. Abraços especiais: D. Ana, Ana Lúcia, Denise, Elzi, Juka, Keiko, Prof. Malavasi, Prof. Matioli, Mirna, Mônica, Prof. Morgante, Nascimento, Pérsio, Vera, Veronezi (*in memoriam*) e a outros amigos e colegas do IB.

Agradeço ao Prof. Francisco G. Nóbrega pela orientação em minha iniciação científica; eu já tinha idéia, mas foi sob sua orientação que entendi o que é ter responsabilidade de desenvolver um projeto de pesquisa. Estende-se este agradecimento à Prof. Marina Nóbrega, à Liliana, à Márcia, ao Mário e à Renata.

À professora Maria C.R.V. Bressan (ICB-USP) e todos seus alunos pela inestimável ajuda, principalmente na manutenção dos bezerros.

À professora Ana Campa (FCF-USP) pelo auxílio e sugestões, além das proveitosas discussões durante nosso trabalho.

Ao Prof. Bianchi pelas sugestões e críticas que muito contribuíram para a elaboração de textos de relatórios e desta dissertação.

Aos professores do Departamento de Parasitologia que disponibilizaram aparelhos ou reagentes, além de contribuir com críticas e sugestões para as

conduções dos experimentos. Em especial aos Professores Carlos Winter, Silvia Alfieri, Marcelo Barcinski, Regina Milder, Terezinha Schumaker.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia que de alguma forma contribuíram para o bom andamento dos trabalhos. Em especial ao Antonio e o Márcio pela manutenção do biotério de animais de grande porte (enquanto ele existiu); ao Wolf, ao Mário Balanco e Beth, pelos auxílios.

A todo o pessoal do Rio de Janeiro representados pelo Prof. Pedro Lagerblad de Oliveira e pela Profa. Teresa Christina Barja-Fidalgo.

À professora Marguerita Barracco (UFSC) pelo auxílio nas análises microscópicas das células.

Aos amigos do laboratório: Cris, Déa, Enios, Mauro, Osvaldo, Pedro, Rosely e Susana; depois: Abraham, Bel, Daniel, Eric, Ernesto e Paulo; e, finalmente, Aline, Cris Heideier, Cris Daffre, Kumie, Marcos e Rodrigo. E aos agregados: Erica, Gisela, Isis e Sergio. A vocês todos, muito obrigado pelo ambiente descontraído e agradável para trabalhar. Realmente as brincadeiras, piadas, festas, cervejadas e bolos (ah! os bolos) tornam o ambiente científico mais produtivo.

Agradeço a todos os amigos e colegas que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e peço desculpas se, por acaso, me esqueci de citar alguém.

Finalmente, agradeço à FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro que tornou viável a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Abstract

1-INTRODUÇÃO.....	14
1.1-Importância parasitária e vetorial dos carrapatos.....	14
1.2-Sistema imunológico de invertebrados.....	16
1.3-Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em vertebrados e invertebrados.....	25
1.4-Detecção de ERO em sistemas biológicos.....	32
2-OBJETIVOS.....	36
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1-Reagentes e Soluções.....	37
3.2-Microorganismos e animais.....	38
3.3-Obtenção de hemolinfa e hemócitos.....	40
3.4-Análise dos tipos celulares majoritários presentes na hemolinfa e índice de fagocitose.....	41
3.5-Detecção de $\cdot O_2^-$ por redução de citocromo c.....	42
3.6-Detecção de $\cdot O_2^-$ e H_2O_2 por luminescência.....	42
3.7-Detecção de H_2O_2 por oxidação de fenol vermelho.....	43
3.8-Detecção e quantificação relativa de H_2O_2 por microscopia de fluorescência.....	44
3.9-Detecção de espécies reativas de oxigênio por fluorimetria.....	45
4-RESULTADOS.....	47

4.1-Tipos majoritários de hemócitos e índice de fagocitose.....	47
4.2-Avaliação da produção de $\cdot\text{O}_2^-$ por hemócitos através da redução de citocromo c.....	50
4.3-Avaliação da produção de $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 por luminescência (LUM) amplificada por luminol.....	50
4.4-Avaliação da produção de H_2O_2 pelos hemócitos através da oxidação de fenol vermelho.....	57
4.5-Detecção de H_2O_2 por microscopia de fluorescência.....	65
4.6-Detecção de espécies reativas de oxigênio por fluorimetria.....	72
5-DISCUSSÃO.....	74
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIM: bisindolilmaleimida III

cys: cisteína

DAG: diacilglicerol;

DCDHF: diclorodihidrofluoresceína;

DHR: dihidrorrodamina;

DMSO: dimetilsulfóxido;

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético;

ERN: Espécie(s) Reativa(s) de Nitrogênio;

ERO: Espécie(s) Reativa(s) de Oxigênio;

FAO: Organização Internacional para questões de Alimentação e Agricultura;

fMLP: N-formil-metionil-leucil-fenillanina

Gr: granulócito;

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance;

HVA: ácido homovanílico;

InsP₃; Inositol 1,4,5-trisfosfato;

LB: meio de cultura Luria-Bertani;

LPS: lipolissacarídeo;

LUM: luminescência;

NADPH: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

NBT: azul de nitrotetrazólio;

NF- κ B: fator nuclear kappa beta;

NOS: óxido nítrico sintetase;

PA: ácido fosfatídico;

PBS: tampão fosfato salino;

PBSS: tampão fosfato salino suplementado com cálcio, magnésio e glicose;

PBS/Sac: tampão fosfato salino suplementado com sacarose;

PDBu: forbol 12,13-dibutirato;

PKC: proteína quinase C;

PI: plasmatócito;

PLC: fosfolipase C;

PLD: fosfolipase D;

PMA: forbol 12-miristato 13-acetato;

PO: fenoloxidase;

POX: peroxidase;

pro-PO: profenoloxidase;

SOD: superóxido dismutase;

UF: unidades de fluorescência;

UFC: unidade formadora de colônia;

RESUMO

Neste estudo avaliamos a ocorrência de fagocitose por parte de alguns tipos celulares presentes na hemolinfa do carrapato bovino *B. microplus* e a produção de espécies reativas de oxigênio durante a resposta imune.

As técnicas empregadas para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio foram luminescência amplificada por luminol, oxidação de fenol vermelho, microscopia de fluorescência e fluorimetria com o corante dihidrorrodamina 123 (DHR).

Observamos um aumento da luminescência amplificada por luminol quando hemócitos foram incubados na presença de bactérias *Micrococcus luteus* ou zimosam ou PMA. Esta luminescência foi inibida por superóxido dismutase (SOD) e por catalase (CAT), enzimas antioxidantes que removem superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente. LPS não elicitou aumento da luminescência dos hemócitos em relação ao controle.

Através da oxidação de fenol vermelho em reação inibida por CAT, verificamos aumento nos níveis de H_2O_2 produzido pelos hemócitos quando estimulados com PMA e *Micrococcus luteus*, enquanto não houve aumento quando o estímulo foi LPS, corroborando os resultados da luminescência.

Usando microscopia de fluorescência para avaliar a produção de ERO pelos hemócitos, encontramos que cerca de 25% dos hemócitos fluorescem com maior intensidade quando estimulados com zimosam, sendo esta fluorescência inibida por CAT. Através de fluorimetria usando DHR observamos um aumento na intensidade de fluorescência dos hemócitos estimulados com PMA em reação

inibida por cisteína, substância redutora que remove peróxido de hidrogênio e peroxinitrito.

Nosso conjunto de resultados permitem concluir que os hemócitos do carrapato bovino produzem espécies reativas de oxigênio durante a resposta imune, semelhantemente ao que ocorre em vertebrados e em invertebrados como moluscos, crustáceos e insetos. Este é o primeiro trabalho mostrando produção de ERO pelos hemócitos de aracnídeos.

ABSTRACT

The phagocytic activity and the reactive oxygen species (ROS) production during immune response of some hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* were evaluated in this study.

The ROS production was evaluated by luminol amplified luminescence, phenol red oxidation, dyhydrorhodamine (DHR) fluorescence microscopy and fluorimetry.

The luminol-amplified luminescence increased when hemocytes were incubated with bacteria (*Micrococcus luteus*) or zymosam or phorbol 12-miristate 13 acetate (PMA). The superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), antioxidant enzymes that removes superoxide and hydrogen peroxide, respectively, inhibited this luminescence. Lipopolysaccharide (LPS) did not elicit luminescence of hemocytes in relation to controls.

The catalase-inhibitable phenol red oxidation assay also showed an increase in the level of hydrogen peroxide produced by hemocytes stimulated with PMA or *Micrococcus luteus*. LPS did not stimulate the hemocytes, similarly to the observed by luminescence assay's.

We also evaluated ROS production by fluorescence microscopy and we found approximately 25% more fluorescent hemocytes when zymosam was used. This fluorescence was inhibited by catalase. In DHR fluorimetry assay we observed an increase in the intensity of fluorescence in PMA stimulated hemocytes. This fluorescence was inhibited by cystein, a reducing agent that removes hydrogen peroxide and peroxinitrite.

We conclude that hemocytes of the tick, like other invertebrate such as mollusks, crustaceans and insects and vertebrate, produce reactive oxygen species during the immune response. This is the first report of reactive oxygen species production by arachnid hemocytes.

1-INTRODUÇÃO

1.1-IMPORTÂNCIA PARASITÁRIA E VETORIAL DOS CARRAPATOS

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas que obrigatoriamente se alimentam de sangue do seu hospedeiro e são encontrados em quase todas as regiões do mundo. Infestam vertebrados terrestres tais como mamíferos, pássaros, vários répteis e anfíbios. Além de suas características como pestes, os carrapatos também são importantes devido aos vários tipos de doenças que eles transmitem ao homem e a outros animais. Grande variedade de organismos patogênicos são transmitidos por carrapatos: fungos, vírus, riquetsias, bactérias e protozoários. Nenhum outro artrópode é vetor de tão ampla variedade de organismos patogênicos. Além do mais, em virtude de suas picadas, os carrapatos podem induzir algumas toxemias em seus hospedeiros (Sonenshine, 1991).

O carrapato *Boophilus microplus* é um aracnídeo pertencente à sub-classe Acarina da classe Arachnida. Esta classe, juntamente com a dos Merostomata, compõe o sub-filo Chelicerata do filo Arthropoda. É a única espécie deste gênero identificada no Brasil e o mais importante ectoparasita de rebanhos bovinos. Está presente em todas as áreas tropicais e sub-tropicais entre os paralelos 32°N e 32°S, abrangendo regiões que se dedicam à pecuária na América, África, Ásia e Austrália (Jonhston *et al.*, 1986; Gonzales, 1995). As perdas econômicas causadas pelo *B. microplus* são estimadas em quase 1 bilhão de dólares ao ano no Brasil (Horn, 1997), quando contabilizadas a queda na produção de leite e

carne, a mortalidade, a redução da natalidade, os gastos no seu controle e a transmissão dos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e da riquetsia *Anaplasma marginale* que causam a Tristeza Parasitária Bovina (Young & Morzaria, 1986). Além de danificar o couro do bovino, prejudicando sua comercialização, o grande volume de sangue sugado pelos carrapatos após fixação pode causar anemia ao hospedeiro e, dependendo do número de carrapatos infestantes, levá-lo à morte (Sonenshine, 1991).

A principal estratégia utilizada no controle ou erradicação do carrapato *B. microplus* é o uso de carrapaticidas. Usando banhos de carrapaticidas os Estados Unidos, em 1943, conseguiram erradicar o carrapato *B. microplus* (Graham & Hourrigan, 1977; Hourrigan, 1977). Porto Rico, em 1952, associando ao uso de carrapaticidas a estratégia de eliminação de pequena população de cervídeos da Ilha, também conseguiram a erradicação (Hourrigan, 1977). Na América do Sul o mesmo sucesso não foi obtido pela Argentina, Uruguai e Nova Guiné com programas iniciados em 1939 e 1940 (Wharton, 1974; Graham & Hourrigan, 1977; Hourrigan, 1977). Atribuíram-se esses insucessos à seleção de linhagens resistentes aos carrapaticidas empregados sem conhecimento adequado da ecologia do carrapato na área (Amaral *et al.*, 1974).

Devido aos danos causados ao ambiente e ao desenvolvimento de resistência por parte dos carrapatos aos carrapaticidas, outras alternativas para seu combate vêm sendo estudadas em vários centros de pesquisa do mundo. Dentre as estratégias estudadas pode-se citar a seleção de bovinos resistentes (Angus, 1996), controle biológico utilizando patógenos ou predadores de carrapatos (Samish & Rehacek, 1999), uso de conhecimentos da ecologia do

carrapato (Spickett, 1994) e o desenvolvimento de vacinas (Willadsen & Jongejans, 1999).

Qualquer que seja a estratégia adotada no controle do carrapato ou dos seus patógenos, ela deve-se basear nos conhecimentos sobre a biologia, ecologia, bioquímica, fisiologia e imunologia tanto do parasita quanto do hospedeiro e das suas interações.

Conhecimento sobre o sistema imunológico dos carrapatos pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle do parasita bem como dos patógenos transmitidos. A maioria dos estudos nessa área enfocam aspectos imunológicos do hospedeiro, enquanto que o sistema imunológico do carrapato vem sendo pouco estudado.

1.2-SISTEMA IMUNOLÓGICO DE INVERTEBRADOS

São conhecidos dois sistemas de defesa utilizados pelos animais para combater e eliminar parasitas e patógenos invasores: a imunidade adaptativa e a inata. O princípio da imunidade adaptativa é a presença de receptores específicos na membrana das células de defesa (e.g., linfócitos em vertebrados). Estes receptores ao interagirem com um antígeno iniciam uma cascata de reações desencadeando a produção de imunoglobulinas (anticorpos) específicas que atuarão na eliminação do antígeno. A imunidade inata não é dependente desta ativação antígeno-receptor específico e, portanto, não há produção de anticorpos específicos (Klein, 1989). Outra importante característica que diferencia a imunidade inata da adaptativa é a memória imunológica, isto é, a capacidade que

o sistema possui de reconhecer determinado antígeno algumas semanas ou mesmo anos após a primeira infecção. A memória imunológica permite que o sistema de defesa responda mais rapidamente a uma nova infecção. Enquanto a imunidade adaptativa apresenta memória imunológica, no sistema inato ela não ocorre.

Os vertebrados possuem tanto imunidade adaptativa quanto inata. Em mamíferos, por exemplo, a imunidade adaptativa é executada pelos linfócitos T e B enquanto a imunidade inata é realizada por células como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos (Klein, 1989). Os invertebrados, por sua vez, apresentam apenas o sistema imune inato, embora proteínas com domínios de imunoglobulinas sejam encontradas (Sun *et al.*, 1990; Ladendorff & Kanost, 1991).

Nos invertebrados a defesa é exercida por componentes presentes na hemolinfa, equivalente ao sangue dos vertebrados. Esta hemolinfa, que circula no interior de todo o corpo do animal, é composta por células (os hemócitos) e o plasma, fluido rico em proteínas, aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, hormônios e vários sais. O sistema imune inato dos invertebrados consiste portanto de reações celulares e humorais tais como melanização, coagulação, atividade de peptídeos antimicrobianos, fagocitose e encapsulação ou formação de nódulos (Millar & Ratcliffe, 1994). Esta divisão da imunidade em celular e humoral é arbitrária e apenas didática, pois na maioria das vezes ocorre interatividade dos dois sistemas: fatores humorais podem atuar como moléculas de reconhecimento facilitando a fagocitose pelas células ou ainda, células podem sintetizar e secretar moléculas humorais como aglutininas, lisinas e peptídeos antimicrobianos.

A melanização é o processo de formação e deposição de melanina ao redor dos organismos invasores. A melanina se origina a partir de quinonas formadas através da ação da enzima fenoloxidase (PO) sobre fenóis. Esta enzima (PO) é sintetizada pelos hemócitos como uma forma inativa (profenoloxidase; proPO) e é convertida na sua forma ativa por uma cascata de serina proteases (Ashida & Brey, 1998). O sistema proPO-PO é bastante eficiente em invertebrados e pode reconhecer e responder à concentrações picomolares de lipopolissacarídeos (LPS) ou peptidoglicanos de bactérias e β -1,3-glucano de fungos (Soderhall & Cerenius, 1998). Estudos recentes mostraram que as hemocianinas (proteínas transportadoras de oxigênio) dos crustáceos *Homarus americanus* e *Carcinus maenas* e do molusco *Octopus vulgaris* possuem atividade similar à fenoloxidase (Zlateva *et al.*, 1996; Salvato *et al.*, 1998).

Os compostos intermediários originados no processo de melanização, como semiquinonas e espécies reativas de oxigênio, e a própria melanina são tóxicos aos microorganismos (Soderhall & Cerenius, 1998).

O fenômeno da melanização é mais bem estudado em insetos (revisão em Marmaras *et al.*, 1996) e crustáceos (Soderhall & Cerenius, 1998). Pouco é conhecido sobre o sistema proPO-PO em aracnídeos. Zhioua *et al.* (1997) não detectaram atividade fenoloxidase nos carrapatos *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis* e *Ixodes scapularis* e sugerem que a não detecção pode ser devida a existência de fatores inibitórios ou, caso exista a enzima, que as condições de ativação são desconhecidas. Em estudos com o carrapato *Boophilus microplus* também não foi verificada atividade fenoloxidase, e nunca foi observada

melanização na hemolinfa de carrapatos infectados (Daffre, comunicação pessoal). Atividade de fenoloxidase foi detectada na hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana* (Daffre & Silva Jr., comunicação pessoal) e na hemocianina da aranha *Eurypelma californicum* (Decker e Rimke, 1998).

Todos os vertebrados possuem um sistema de coagulação baseado na agregação de fibrinogênio formando fibrina insolúvel. O agregado de fibrina é estabilizado por ligações covalentes cruzadas formadas a partir da enzima transglutaminase proteoliticamente ativada. Esta enzima é dependente de íons Ca^{+2} e capaz de formar ligações covalentes entre resíduos de lisina ou glutamina de cadeias laterais de certas proteínas. O sistema de coagulação é pouco conhecido em invertebrados, exceto em limulídeos (animais filogeneticamente próximos aos aracnídeos) e crustáceos. Nos limulídeos o sistema de coagulação é ativado por lipolissacarídeos ou β -1,3-glucanos microbianos e é baseado numa cascata proteolítica que origina um agregado insolúvel (coagulina) a partir de uma proteína solúvel (coagulogênio), de certa forma semelhante aos vertebrados. Entretanto, nos limulídeos, as proteínas participantes do sistema são geradas pelos hemócitos e não são homólogas às proteínas de coagulação do plasma de vertebrados (Kawabata *et al.*, 1996).

Em crustáceos a coagulação é induzida quando uma transglutaminase liberada pelos hemócitos ou tecidos é ativada por íons Ca^{+2} no plasma e dá início à formação de agregados a partir de proteínas de coagulação específicas presentes no plasma (Kopacek *et al.*, 1993; Komatsu & Ando, 1998). Além de constituir um sistema de defesa, no qual os organismos invasores são eliminados,

a coagulação é importante para evitar o vazamento da hemolinfa devido a algum ferimento provocado na cutícula dos animais (Iwanaga *et al.*, 1998).

Nenhum estudo da coagulação em aracnídeos são reportados na literatura, porém, em ensaios no nosso laboratório, com hemócitos da aranha *A. gomesiana* foi verificada a ocorrência de coagulação induzida por bactérias, mostrando que este mecanismo é utilizado como defesa contra infecção por este animal (Daffre & Silva Jr., comunicação pessoal).

Peptídeos antimicrobianos são fatores importantes na imunidade inata tanto de animais quanto de plantas (revisão em Boman, 1995 e em Broekaert *et al.*, 1995). Grande parte dos peptídeos e proteínas antimicrobianas foram detectadas em invertebrados, onde as moléculas são sintetizadas principalmente nos corpos gordurosos (Sondergard, 1993), mas também são produzidas por hemócitos (Boman, 1991), células epiteliais da cutícula (Brey *et al.*, 1993), células intestinais (Daffre *et al.*, 1994), glândulas salivares (Kylsten *et al.*, 1992; Moreira-Ferreira *et al.*, 1998) e no trato reprodutivo (Samakovlis *et al.*, 1991; Rosetto *et al.*, 1996).

Apesar das diferentes estruturas descritas para os peptídeos antimicrobianos algumas características são comuns: são pequenos (menores que 10 kDa), catiônicos e anfipáticos. Devido a estas características, o principal modo de ação destes peptídeos é promovendo a lise dos parasitas e patógenos invasores (revisões em Boman, 1995; Bulet *et al.*, 1999; Andreu & Rivas, 1998).

Muitos peptídeos antimicrobianos têm sido descritos e caracterizados principalmente em insetos (revisão em Bulet *et al.*, 1999). Peptídeos antimicrobianos já foram isolados e caracterizados em três quelicerados:

limulídeos, escorpiões e aranhas.

Limulídeos possuem vários peptídeos ricos em cisteína (taquiplesina, polifemusina, taquicitina, taquistatina, e "big" defensina) e dois sem cisteína (fator anti LPS e fator D) com atividade inibitória sobre o crescimento de bactérias e fungos (revisão em Iwanaga *et al.*, 1998).

Alguns peptídeos antimicrobianos foram isolados a partir da hemolinfa dos escorpiões *Leiurus quinquestriatus* (Cociancich *et al.*, 1993) e *Androctonus australis* (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996). Enquanto somente uma molécula do tipo defensina foi encontrada em *L. quinquestriatus*, três foram caracterizadas em *A. australis*: uma defensina similar à de insetos (ativa principalmente contra bactérias Gram-positivas), androctonina (ativa contra bactérias e fungos) e butinina (ativa somente contra fungos).

Recentemente Yan & Adams (1998) isolaram toxinas (licotoxina I e II) com atividade antibacteriana do veneno da aranha *Lycosa cariolenses*. Estas toxinas não possuem resíduos de cisteína e mostraram similaridade com peptídeos antimicrobianos de rãs como magainina, adenoregulina e dermaseptinas.

Nosso laboratório vem estudando o sistema imune da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, com ênfase em peptídeos antimicrobianos. Quatro peptídeos antibacterianos foram isolados, sendo caracterizados por espectrometria de massa e sequenciamento de aminoácidos. Esses peptídeos foram purificados por extração de fase sólida e cromatografia de fase reversa e filtração em HPLC. Um desses peptídeos foi purificado do plasma (theraphosinina) e os outros três de hemócitos (gomesina, acanthoscurrina e AGH1).

Gomesina é um peptídeo rico em cisteína e similar à taquiplesinas e

polifemusinas de limúlídeos, androctonina de escorpião e protegrina de suínos. Este peptídeo apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas, fungos filamentosos, leveduras e afetou a viabilidade do parasita *Leishmania amazonensis* (Silva Jr. *et al.*, 2000a).

Acanthoscurrina foi ativa contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*) e contra o fungo *Candida albicans* (Silva Jr. *et al.*, 2000b). Comparação da acanthoscurrina com outros peptídeos demonstrou alto grau de similaridade com proteínas antifúngicas de insetos (holtricina 3, tenecina 3 e AFP) e com uma proteína de defesa de plantas (GRP PETHY).

A molécula AGH1 foi purificada e estudos quanto à sua caracterização e espectro de atividade contra microorganismos estão em andamento (Daffre & Silva Jr., comunicação pessoal)

Theraphosinina não apresentou similaridade com nenhuma proteína descrita e foi ativa contra a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (Daffre & Silva Jr., comunicação pessoal).

Estudos sobre a presença e ação destes peptídeos em carrapatos também são muito recentes. Johns *et al.* (1998), estudando o carrapato *Dermacentor variabilis*, relataram a presença de dois fatores hemolinfáticos, possuindo um deles características semelhantes à lisozima, com atividade contra *Bacillus subtilis*. Fogaça *et al.* (1999) relataram a presença de atividade antifúngica e antibacteriana na hemolinfa e no conteúdo intestinal do carrapato bovino *B. microplus*. Surpreendentemente se verificou que o peptídeo responsável pela atividade no conteúdo intestinal é idêntico a um fragmento da α -hemoglobina

bovina, levando à conclusão de que os carrapatos processam a proteína do hospedeiro e a utiliza na defesa contra microorganismos.

Nas reações imunes celulares em invertebrados, os hemócitos são responsáveis pela imobilização dos agentes invasores através da nodulação, encapsulação e da fagocitose. Quando a concentração de microorganismos invasores é baixa, o principal mecanismo utilizado para eliminá-los é a fagocitose; quando é alta as células se agregam ao redor dos microorganismos, formando nódulos ou cápsulas (Marmaras *et al.*, 1996).

Os mecanismos moleculares envolvidos nos processos de defesa através da nodulação e encapsulação ainda são pouco compreendidos. Estudos com o inseto *Drosophila melanogaster* (Nappi *et al.*, 1995; Nappi & Vass, 1998a) e com o molusco *Lymnaea stagnalis* (Adema *et al.*, 1994) mostraram que durante a encapsulação melanótica há formação de intermediários melanogênicos reativos como quinonas, semiquinonas e hidroquinonas e também espécies reativas de oxigênio (ERO). Semiquinonas e hidroquinonas reduzem oxigênio molecular formando superóxido, o qual por sua vez, reage com hidroquinonas originando peróxido de hidrogênio (Nappi *et al.*, 1995).

Células cujas funções são reconhecer, englobar e destruir organismos invasores são genericamente chamadas de fagócitos e o processo é conhecido como fagocitose. A fagocitose em vertebrados, juntamente com fatores humorais, representa um importante mecanismo de defesa e é exercido por células tais como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos. Diferentes mecanismos são empregados por estas células em sua atividade citotóxica e microbicida. Um deles envolve enzimas hidrolíticas armazenadas em grânulos citoplasmáticos que

se fundem com o fagossomo após a internalização de partículas estranhas. Outro mecanismo usado é baseado no metabolismo dependente de oxigênio, iniciado pela ativação do complexo enzimático NADPH-oxidase localizado na membrana plasmática, onde são formadas espécies reativas de oxigênio tais como íons superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e hipohaleto. Estas substâncias são ativas contra microorganismos e também contra células tumorais (Moreno-Manza *et al.*, 2000).

Nos invertebrados, os hemócitos circulantes são as principais células responsáveis pela fagocitose de bactérias, protozoários e fungos. Como em vertebrados, a fagocitose envolve os estágios de reconhecimento, ingestão e morte do invasor. Na fase de reconhecimento estão envolvidas opsoninas que recobrem o material invasor e se ligam a receptores presentes na superfície dos hemócitos. Fatores opsonizantes importantes na resposta imune já foram descritos em invertebrados (revisão em Bayne & Fryer, 1994). Na fase de ingestão o organismo é internalizado em um fagossomo através de pseudópodes ou invaginações da membrana plasmática. No citoplasma, os microorganismos ingeridos são expostos a um conjunto de fatores antimicrobianos. Entre estes fatores estão enzimas hidrolíticas (fosfatase ácida, esterases, peroxidases, lisozima, β -N-acetil-glucosaminidase e serina proteases) e espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio. O mecanismo mais estudado, e talvez o melhor compreendido, tanto em vertebrados quanto em invertebrados pelo qual um microorganismo é morto por células fagocíticas é o ataque por espécies reativas de oxigênio.

1.3-PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) EM VERTEBRADOS E INVERTEBRADOS

Embora o oxigênio seja fundamental para organismos vivos, espécies intermediárias reativas que se formam em suas reações são extremamente prejudiciais aos componentes celulares como lipídeos, ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, etc. Estas espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas através de reações químicas com transferência de elétrons ou de energia. No primeiro caso, a adição sucessiva de elétrons ao oxigênio molecular, O_2 , dá origem a uma série de compostos intermediários, o primeiro sendo o ânion radical superóxido:

Em sistemas biológicos, considerável atenção tem sido dada à produção do radical superóxido, já que esta espécie em pH fisiológico rapidamente sofre dismutação produzindo peróxido de hidrogênio:

A partir do peróxido de hidrogênio, na presença de íons metálicos, pode ocorrer a produção de radicais hidroxil através de reação conhecida como reação de Haber-Weiss/Fenton:

Devido ao caráter altamente tóxico do radical hidroxil, as células utilizam mecanismos para evitar sua formação, eliminando o íon superóxido e o composto peróxido de hidrogênio, sendo que a primeira linha de defesa é enzimática envolvendo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidases (POX). A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a reação que remove radicais superóxido:

Catalase e peroxidases removem H_2O_2 :

onde RH_2 é um substrato redutor (Felton & Summers, 1995; Rosen *et al.*, 1995).

Um mecanismo alternativo que evita a formação de radicais hidroxil nos ambientes intra e extracelular consiste em regular a presença de íons de ferro disponíveis. Isto explica a presença nas células de aminoácidos e macromoléculas que ligam ferro como ferritina, transferrina e lactoferrina (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Entre as fontes celulares de íons superóxido e peróxido de hidrogênio em mamíferos estão a cadeia de transporte microssomal e as NADPH oxidases em fagócitos (neutrófilos e macrófagos). Durante o processo de fagocitose as células envolvidas têm significativamente aumentado o consumo de oxigênio molecular. Este súbito aumento do consumo de oxigênio é comumente chamado "burst oxidativo" ou "burst respiratório", sendo esta última denominação mais imprópria devido não haver relação com a respiração mitocondrial, pois íons cianeto (inibidor da cadeia de transporte eletrônico da mitocôndria) não inibem o consumo de oxigênio. Concomitantemente, ocorre um aumento no metabolismo de glicose nas células pela via das pentoses-fosfato (Halliwell & Gutteridge, 1989).

O rápido aumento no consumo de oxigênio ocorre após a formação de um complexo enzimático associado à membrana plasmática, o complexo NADPH-oxidase ([FIGURA1](#)). A formação deste complexo se dá após interação de receptores específicos presentes nas membranas das células com o material a ser fagocitado. Uma vez "perturbados", estes receptores ativam as enzimas fosfolipases C (PLC) e D (PLD) em um processo mediado por uma proteína G trimérica. Fosfolipase C cliva fosfatidil-inositol 4,5-bis-fosfato originando diretamente diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (InsP_3), enquanto

FIGURA 1: Mecanismo de formação de espécies reativas de oxigênio via complexo NADPH-oxidase (adaptado de Morel et al., 1991). Abreviações: R=receptor; G= proteína G; PLC: fosfolipase C; PLD: fosfolipase D; DAG: diacilglicerol; PA: ácido fosfatídico; PKC: proteína quinase C; CF: fatores citissólicos; InsP₃: inositol 1,4,5 trifosfato; P: fosfato

fosfolipase D hidrolisa fosfolipídeos originando ácidos fosfatídicos (PA) que serão degradados a diacilglicerol por hidrolases. InsP_3 , após interação com receptores da membrana de calciossomas induz a rápida liberação destes íons. DAG e íons Ca^{+2} ativam a proteína quinase C (PKC), passo fundamental para ocorrer fosforilação de proteínas citossólicas, que se translocam até a membrana e fazem parte do complexo enzimático (Morel *et al.*, 1991).

Substâncias que interagem com qualquer dos componentes nesta sequência de reações podem interferir na formação funcional do complexo NADPH-oxidase. O composto bisindolilmaleimida III (BIM), particularmente, inibe ação da proteína quinase C (Toullec *et al.*, 1991) impedindo a fosforilação das proteínas citossólicas e seus translocamentos até a membrana e, conseqüentemente levando à formação não funcional do complexo NADPH-oxidase.

A produção de espécies reativas de oxigênio pelo sistema NADPH-oxidase independente de PKC já foi detectada em neutrófilos por Kawakami *et al.* (1998). O tratamento de neutrófilos com pervanadato resultou na translocação dos fatores citossólicos (p47-phox e p67-phox) até a membrana plasmática e a ativação da enzima NADPH-oxidase. No entanto, um conhecido inibidor de PKC (H-7), inibiu a translocação dos fatores mas não inibiu a atividade NADPH-oxidase. Quando os neutrófilos foram estimulados com PMA, o H-7 inibiu tanto a translocação dos fatores citossólicos quanto a atividade NADPH-oxidase. Resultados anteriores do mesmo grupo mostraram que o tratamento de neutrófilos com pervanadato resultou na fosforilação de resíduos de tirosina da fosfolipase C- γ 2 (PLC- γ 2)

(Kawakami *et al.*, 1996). Baseando-se neste conjunto de resultados os autores sugerem que a ativação do sistema NADPH-oxidase e a geração de íons superóxido, por neutrófilos estimulados com pervanadato, não dependem da translocação das proteínas p47-phox e p67-phox até a membrana plasmática, mas da fosforilação de resíduos de tirosina da enzima fosfolipase C- γ 2.

Além de microorganismos e parasitas, a atividade NADPH-oxidase (que é dormente em células não desafiadas imunologicamente) pode ser estimulada por uma grande variedade de compostos como forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), ácidos graxos insaturados, análogos do peptídeo bacteriano N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), concanavalina A, ionóforos, zimosan (zim), bactérias opsonizadas ou não, lipopolissacarídeo (LPS), latex, etc (Henderson & Chappell, 1996). Uma vez organizado e funcional na membrana, este complexo enzimático catalisa a oxidação do composto NADPH (produzido pela via pentose fosfato a partir de glicose) a NADP^+ , sendo os elétrons liberados nesta oxidação utilizados para a redução do oxigênio molecular ao ânion radical superóxido, O_2^- (Halliwell & Gutteridge, 1989; Cadenas, 1995)

Acredita-se que o ânion superóxido produzido por este mecanismo tenha importante papel de defesa contra agentes patógenos por células fagocíticas, não pela sua reatividade em si, mas pelos produtos de suas reações, principalmente o peróxido de hidrogênio.

A toxicidade do peróxido de hidrogênio é enormemente aumentada na presença de peroxidases liberadas a partir de grânulos citoplasmáticos presentes nas células fagocíticas. Estas enzimas, na presença de íons cloreto (Cl^-) e peróxido de hidrogênio catalisam a reação de formação do ácido hipocloroso (HClO), agente oxidante altamente tóxico a uma ampla variedade de microorganismos (Rosen *et al.*, 1995):

Como visto anteriormente, a interação entre H_2O_2 e $\cdot\text{O}_2^-$ em reação catalisada por íons metálicos (por exemplo Fe^{+3}) leva à formação do radical hidroxil, $\text{HO}\cdot$.

A produção de espécies reativas de oxigênio relacionada com a resposta imunológica em invertebrados já foi descrita em crustáceos (Bell & Smith, 1993; Song & Hsieh, 1994; Akita & Hoshi, 1995), insetos (Nappi *et al.*, 1995; Arakawa, 1994), moluscos (Nakamura *et al.*, 1985; Dikkeboom *et al.*, 1988; Pipe, 1992; Adema *et al.*, 1994; Anderson, 1994), ascídeas (Ballarin *et al.*, 1994) e equinodermos (Ito *et al.*, 1992). Em quelicerados (merostomados e aracnídeos) nada se sabe sobre a produção de espécies reativas de oxigênio na resposta imunológica.

Após a descoberta de que células fagocíticas podem produzir óxido nítrico (NO) em reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (Moncada & Higgs, 1993), vários estudos têm demonstrado que o ânion superóxido reage rapidamente com este composto produzindo peroxinitrito (OONO^-):

O peroxinitrito é um forte agente oxidante que, segundo estudos recentes, possui atividade microbicida (Denicola *et al.*, 1993; Brunelli *et al.*, 1995; Augusto *et al.*, 1996). Em invertebrados, atividade óxido nítrico sintetase (NOS) foi demonstrada em hemócitos do limulídeo *Limulus polyphemus* por Radomski *et al.*, 1991 (citados em Weiske & Wiesner, 1999), do molusco *Viviparus ater* (Conte & Ottaviani, 1995) e do inseto *Estigmene acraea* (Wieske & Wiesner, 1999).

1.4-DETECÇÃO DE ERO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Vários métodos são empregados na detecção da produção *in vitro* de espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos. Entre os mais empregados pode-se citar os quimiluminescentes, os espectrofotométricos e os fluorescentes. Qualquer que seja o método utilizado é necessário estimular a atividade oxidase pela adição de concentrações adequadas de estimuladores e usar inibidores para caracterizar especificamente a formação de uma determinada espécie reativa.

A emissão de fótons é um fenômeno freqüentemente associado à produção de espécies oxidantes pelas células fagocíticas e recebe o nome de quimiluminescência ou luminescência. Para se detectar esta luminescência das células, normalmente são usados marcadores que amplificam a luminescência como luminol e lucigenina. Estes marcadores são substâncias orgânicas que servem como substratos para reações redox e geram produtos eletronicamente

excitados emissores de fótons. Para se detectar a emissão de fótons podem ser usados espectrômetros de cintilação líquida com circuito de coincidência desligado ou em aparelhos específicos para detecção de luz (luminômetros) (Allen, 1986; Halliwell & Gutteridge, 1989).

As reações amplificadas por luminol têm sido vastamente utilizadas para se demonstrar a produção de espécies oxidantes por células fagocíticas (revisão em Dahlgren & Karlsson, 1999). Para amplificar a luminescência, o luminol deve ser monoelétricamente oxidado produzindo o radical luminol, que ao sofrer nova oxidação monovalente produz um endoperoxídeo instável. Este endoperoxídeo se decompõe originando o ânion aminoftalato em estado excitado. A luminescência é produzida quando o ânion aminoftalato decai ao estado fundamental, emitindo fótons (Faulkner & Fridovich, 1993; Dahlgren & Karlsson, 1999).

A partir da luminescência amplificada por luminol é possível detectar íons superóxido (Faulkner & Fridovich, 1993) e peroxinitrito (Radi *et al.*, 1993) devido estes oxidantes reagirem com o radical luminol para formar o endoperoxídeo. A detecção de peróxido de hidrogênio é também possível devido esta substância ser capaz de oxidar o luminol na presença de peroxidase, originando o radical luminol (Wymann *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1991). A distinção entre as espécies oxidantes pode ser feita através do uso de "scavengers" ou enzimas antioxidantes específicas como SOD e CAT.

Além de luminescência amplificada por luminol, a produção de peróxido de hidrogênio também pode ser detectada empregando-se substratos fenólicos. A detecção se baseia em alterações na fluorescência ou absorbância do sistema devido à oxidação dos grupos fenólicos pela combinação H_2O_2 /peroxidase. Um

composto bastante usado para esse propósito é o fenol vermelho cuja oxidação provoca mudança na absorbância medida em 600 nm (Pick e Mizel, 1981).

Recentemente, vários autores têm usado marcadores fluorescentes como 2,7 diclorodihidrofluoresceína (DCDHF) e a dihidrorrodamina 123 (DHR) para se detectar a produção de espécies reativas pelas células (Henderson & Chappell, 1993; Hempel *et al.*, 1999; Nappi & Vass, 1998). DHR não é fluorescente mas, ao entrar nas células, sofre oxidação originando o composto fluorescente rodamina. Entre os oxidantes que interagem com DHR originando fluorescência estão o sistema H_2O_2 -peroxidase, ácido hipocloroso e peroxinitrito (Ischiropoulos *et al.*, 1999). A fluorescência resultante pode ser detectada em fluorímetro, citômetro de fluxo (Flow Cytometric Analysis Scan-FACS) ou através de imagens em microscópio de fluorescência.

Outras técnicas empregadas na detecção de espécies oxidantes (revisão em Jones & Hancock, 1994) são:

- redução de citocromo c em reação inibida por SOD: usada para detectar superóxido através de monitoramento do aumento da absorbância da banda α do citocromo em 550nm;
- redução de azul de nitrotetrazólio (NBT): ânion superóxido reage com NBT formando um precipitado azul escuro (diformazano) em reação inibida por SOD;
- oxidação de escopoletina por H_2O_2 : método baseado na diminuição da fluorescência da escopoletina na sua forma reduzida após reação com peróxido de hidrogênio;
- consumo de oxigênio: usando eletrodos de Clark ou análogos, é possível medir

eletroquimicamente o consumo de oxigênio durante o "burst" oxidativo;

É importante salientar que nenhum dos métodos utilizados para detecção de espécies oxidantes produzidas por sistemas celulares está livre de artefatos que influenciam nas reações. O uso adequado de inibidores ou "scavengers" juntamente com controles pertinentes ao experimento, porém, auxiliam nas conclusões.

2-OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram os seguintes:

- caracterizar os tipos majoritários de hemócitos do carrapato *B. microplus* e relacionar com outras classificações utilizadas para outros animais invertebrados, principalmente grupos próximos como outros aracnídeos, insetos, crustáceos e moluscos;
- analisar a ocorrência de fagocitose *in vivo* e *in vitro* por parte dos hemócitos do carrapato;
- aplicar técnicas descritas na literatura para verificar a ocorrência, *in vitro*, da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por parte dos hemócitos do carrapato e relacioná-la com a resposta imunológica;
- relacionar a produção de espécies reativas de oxigênio com tipos celulares envolvidos no processo de fagocitose;
- estudar alguns aspectos do mecanismo de produção de ERO por parte dos hemócitos do carrapato e relacioná-los com outros organismos (vertebrados e invertebrados) já reportados na literatura;
- verificar a ocorrência da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN), concomitantemente à produção de ERO, na resposta imunológica do carrapato;

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-REAGENTES E SOLUÇÕES

O tampão fosfato salino (PBS), pH7,4 foi preparado em água destilada (10 mmol/L de Na_2HPO_4 , 2 mmol/L de KH_2PO_4 , 0,14 mmol/L de NaCl e 2,7 mmol/L de KCl). Este tampão foi usado para preparar as soluções estoques de azul de tripan 0,4% (m/v), luminol 0,8 mmol/L contendo 1mmol/L de NaOH, lucigenina 0,75 mmol/L, citocromo c 0,75 mmol/L, fenol vermelho (1mg/mL), cisteína (cis) 75mmol/L, catalase (CAT) de fígado bovino 100U/ μL , superóxido dismutase (SOD) 5U/ μL e peroxidase (POX) 0,6U/ μL . Solução de tampão PBS suplementado (PBSS) com íons Ca^{+2} (1,25mmol/L), Mg^{+2} (0,8mmol/L) e glicose (1mg/mL) foi usada nas incubações dos hemócitos. Em alguns experimentos de redução de citocromo c usou-se o tampão PBS suplementado com 0,1mol/L de sacarose (PBS/sac).

A suspensão de zimosan (zim) foi preparada adicionando-se 4 mg (aproximadamente 1×10^8 partículas) em 1mL de PBS e aquecida a 100 °C por 30min. A suspensão resultante foi armazenada a -20 °C.

O lipolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* foi suspenso em PBS na concentração de 2mg/mL. Imediatamente antes do uso a suspensão foi sonicada em banho de ultrassom (Thornton MS-200) por 2 minutos.

O corante Giemsa foi preparado na concentração de 0,4% em metanol (m/v).

O solvente dimetil-sulfóxido (DMSO) foi usado para dissolver o forbol 12-

miristato, 13-acetato (PMA) 0,1mg/mL, bisindolilmaleimida III (BIM) 10µmol/L e o marcador fluorescente dihidrorrodamina 123 (DHR) 50mmol/L. Imediatamente antes dos experimentos estes reagentes foram apropriadamente diluídos em PBS.

3.2- MICROORGANISMOS E ANIMAIS

3.2.1-MICROORGANISMOS

Uma suspensão da levedura *Saccharomices cerevisiae* foi preparada adicionando-se uma pequena porção de fermento comercial fleishmann em PBS pH 7,4 e o título ajustado para 1×10^9 células/mL.

As bactérias *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* D31 e *Enterobacter cloacae* K12 cresceram em meio líquido de cultura LB (Luria-Bertani) suplementado com os antibióticos ácido nalidíxico (2,5µg/mL), ampicilina (50µg/mL) e estreptomicina (50µg/mL), respectivamente. Ainda em fase exponencial de crescimento e imediatamente antes do uso as bactérias foram coletadas por centrifugação por 10 minutos a 8000 xg (4 °C) e ressuspensas em PBS.

3.2.2-CARRAPATOS

O ciclo de desenvolvimento do carrapato *B. microplus* compreende entre 45 e 50 dias (FIGURA2). Nesse período as fêmeas do carrapato passam pelas fases de ovo, larva, ninfa e adulto. Após a fixação das larvas no couro do bovino, inicia-se o processo de sucção do sangue. Em aproximadamente 20 dias as fêmeas

FIGURA 2: Ciclo de desenvolvimento do carrapato bovino *Boophilus microplus* (cortesia do Prof. Dr. M. C. Pereira - Parasitologia - ICB - USP). A = adulto; O = ovo; L = larva; N = ninfa

passam pela fase de ninfa e atinge-se o estágio de partenóginas (fêmeas virgens parcialmente ingurgitadas). Nesse período, o volume de sangue bovino sugado pelo carrapato é relativamente pequeno mas, as fêmeas têm seu volume praticamente triplicado nos cinco dias seguintes, atingindo uma fase mais avançada chamada teleógina (fêmeas fertilizadas). Após ingurgitação máxima, as fêmeas completamente ingurgitadas naturalmente se desprendem do couro do bovino e iniciam a oviposição. Em aproximadamente 15 a 20 dias as larvas emergem fechando o ciclo.

Foram utilizadas fêmeas parcialmente ou completamente ingurgitadas (fertilizadas ou não) de carrapato *Boophilus microplus* da cepa de Porto Alegre/Palmas, isolada em Bagé (RS). Esta cepa foi utilizada devido não estar contaminada por *Babesia* sp. Os carrapatos foram mantidos em bezerros da raça holandesa no biotério de animais de grande porte do ICB-USP, sob a responsabilidade da Dra. Maria Cecília R.V. Bressan (Departamento de Parasitologia, ICB, USP).

3.3-OBTENÇÃO DE HEMOLINFA E HEMÓCITOS

Em cada carrapato fez-se um pequeno orifício na parte dorsal posterior e pressionou-se levemente a parte anterior até que o máximo possível de hemolinfa fosse expelida. A hemolinfa coletada através de um tubo capilar de 5 µL de capacidade foi dispensada em tubo de plástico tipo “eppendorf” de 1,5 mL de capacidade mantido em gelo. Para evitar a agregação celular e facilitar o

isolamento dos hemócitos, a hemolinfa foi dispensada sobre PBS contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) de modo que a concentração final deste ácido se tornasse 2,5 $\mu\text{mol/L}$. Em seguida a suspensão de células foi submetida à centrifugação por 10 minutos a 300 xg (4 °C) e os hemócitos ressuspensos em PBS. O número de hemócitos viáveis foi estimado a partir de contagem em câmara de Neubauer usando Azul de Tripán 0,16% (m/v; concentração final).

3.4-ANÁLISE DOS TIPOS CELULARES MAJORITÁRIOS NA HEMOLINFA E ÍNDICE DE FAGOCITOSE

Para analisar os tipos celulares presentes na hemolinfa do carrapato e verificar quais e quantas células fagocitam, injetamos fêmeas parcialmente ingurgitadas com 1 μL da suspensão de *S. cerevisiae* (1×10^6 células) utilizando-se uma seringa Hamilton. Aproximadamente 3,5 h após a injeção coletamos 5 μL de hemolinfa com auxílio de um capilar, depositamos sobre 20 μl de PBS previamente colocado numa lâmina de vidro. Em seguida a suspensão resultante foi coberta com lamínula e analisada por microscopia óptica de contraste de fase (Zeiss, Axiophot). Como controle usamos hemolinfa de fêmeas não injetadas.

Paralelamente, 3 μL de hemolinfa de fêmeas injetadas foram colocados sobre lâmina de vidro e realizamos um esfregaço. As células foram fixadas por metanol durante 10 minutos, secas à temperatura ambiente e coradas durante 20 minutos com corante Giemsa diluído 20 vezes (título final: 0,02%) em água destilada. Após secagem da preparação, as células foram analisadas sob

microscopia óptica (Zeiss, Axiophot). Como controle usamos hemolinfa de fêmeas não injetadas. O índice de fagocitose ocorrida *in vivo* foi determinado, após contagem e análise de aproximadamente 500 células, dividindo-se o número de células contendo material fagocitado pelo número total de células analisadas e o resultado final expresso em porcentagem.

3.5- DETECÇÃO DE $\cdot\text{O}_2^-$ POR REDUÇÃO DE CITOCROMO C

Para se detectar a produção de $\cdot\text{O}_2^-$ pelos hemócitos do carrapato acompanhamos a variação da absorbância da mistura de incubação a 550 nm em espectrofotômetro de feixe duplo (Varian, UV-VIS 634-s) por 10 minutos à temperatura ambiente. A mistura de incubação foi preparada adicionando, nesta ordem, 15 μL de citocromo c (concentração final 11,25 $\mu\text{mol/L}$), aproximadamente 100 μL de hemolinfa ou de uma suspensão de hemócitos recém coletados de fêmeas completamente ingurgitadas (cerca de 1×10^5 hemócitos) e 30 μL de suspensão de *E.coli* D31 (1×10^6 UFC) ou 50 μL de *E. cloacae* (1×10^6 UFC). A coleta da hemolinfa foi realizada três dias após a queda das fêmeas. Os componentes da mistura de reação foram adicionados sobre um volume de PBS/sac suficiente para completar 1 mL.

3.6- DETECÇÃO DE $\cdot\text{O}_2^-$ E H_2O_2 POR LUMINESCÊNCIA

Para se detectar a luminescência amplificada por luminol e lucigenina

utilizamos espectrômetro de cintilação líquida (Beckman) com circuito de coincidência desligado. A luminescência das misturas de incubação em frascos de vidro foi medida a cada 5 minutos aproximadamente. A mistura de reação foi preparada adicionando-se sobre PBSS para um volume final de 1 mL, nesta ordem, 40 µL de luminol (concentração final de 32µmol/L) ou 100 µL de lucigenina (concentração final de 75µmol/L), cerca de 40µL de suspensão de hemócitos (1×10^5 hemócitos) ou hemolinfa ou plasma recém coletados. O tampão suplementado (PBSS) propiciou um ambiente mais próximo do fisiológico e favorável à fagocitose. Para estimular as células e verificarmos variações na luminescência do sistema usamos forbol 12-miristato, 13-acetato (PMA), bactérias, zimosan (zim) e lipolissacarídeo (LPS) em concentrações variáveis. A contribuição dos íons superóxido e do peróxido de hidrogênio para o aumento da luminescência foi verificada adicionando-se, após um certo tempo de reação ou desde o início da incubação, as enzimas superóxido dismutase (SOD, 50U/mL), catalase (CAT, 500U/mL) ou peroxidase (POX, 3U/mL).

3.7- DETECÇÃO DE H₂O₂ POR OXIDACÃO DE FENOL VERMELHO

A produção de peróxido de hidrogênio pelos hemócitos foi avaliada em misturas de reações preparadas adicionando-se, nesta ordem, 50 µL de fenol vermelho (concentração final 265 µmol/L), PBSS suficiente para um volume final de 1 mL, 1×10^5 células (cerca de 40 µL de suspensão em PBS) recém coletadas de fêmeas parcialmente ingurgitadas, 20 µL de PMA diluído em PBS

(concentração final 100 ng/mL) ou 20 µL de LPS (concentração final 40 µg/mL) ou 5×10^5 UFC de *Micrococcus luteus*, 5 µL de peroxidase (concentração final 3U/mL). Após incubação de uma hora a 30 °C os tubos foram centrifugados a 300 x g por 10 minutos a 4 °C para sedimentação dos hemócitos (os sobrenadantes obtidos nos experimentos com bactérias foram submetidos a nova centrifugação a 8000 x g por 10 minutos a 4 °C para sedimentação deste material). Após as centrifugações adicionou-se 10 µL de NaOH 1mol/L em cada mistura de reação. Em experimentos controles foram acrescentadas, desde o início das incubações, 100 U de catalase às misturas de reação.

A quantidade de H₂O₂ em cada experimento foi determinada medindo-se e comparando-se as absorbâncias das misturas de incubação com as obtidas a partir de curva padrão contendo de 2 a 10 nmols de peróxido de hidrogênio na presença de peroxidase e fenol vermelho. Uma curva padrão foi feita para cada experimento nas mesmas condições e paralelamente ao ensaio. As absorbâncias foram medidas a 600 nm em espectrofotômetro de feixe duplo (Varian, UV-VIS 634-s) usando como referência cubeta contendo fenol vermelho, peroxidase e PBSS.

Em alguns experimentos foram adicionados à mistura de reação 50U de SOD ou 50 nmol/L de bisindolilmaleimida (BIM; concentração final).

3.8-DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE H₂O₂ POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Estes ensaios consistiram em colocar sobre lamínulas de vidro, 16 μL de DHR previamente diluído em PBS (concentração final 10 $\mu\text{mol/L}$) sobre PBSS suficiente para o volume final de 80 μL . Em seguida 5 a 10 μL de uma suspensão de hemócitos (aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células) e 10 μL de suspensão de zimosan (cerca de 1×10^4 partículas) foram adicionados sobre o meio de incubação. Nos experimentos controles foram colocados 500U de CAT (5 μL de solução diluída em PBS) imediatamente antes da adição das células e zimosan. Incubaram-se as preparações por 60 minutos a 30 °C na ausência de luz. Após este tempo, as preparações foram lavadas com PBS, analisadas por microscopia de fluorescência (Zeiss, Axiophot) e as imagens digitalizadas para posterior quantificação das fluorescências das células, usando o programa MetaMorph (Universal Imaging Corp.).

A intensidade relativa de fluorescência de cada célula foi obtida delimitando-se a área da célula, integrando-se os níveis de cinza da imagem e comparando-se o resultado da integração com níveis de cinza previamente calibrados pelo programa. Com o resultado de cada célula construíram-se histogramas a partir de cem células analisadas.

3.9-DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR FLUORIMETRIA

A produção de espécies reativas por parte dos hemócitos de carrapato foi avaliada em misturas de reação preparadas adicionando-se, nesta ordem, PBSS suficiente para volume final de 1 mL, 25 μL de DHR recém diluído em PBS

(concentração final 5 $\mu\text{mol/L}$), 1×10^5 hemócitos (cerca de 20 μL de suspensão em PBS), 20 μL de PMA (concentração final 100 ng/mL). As misturas de reação foram incubadas por uma hora a 30 °C. Nos experimentos controles adicionamos 15 μL de cisteína, um potente inibidor da oxidação de DHR. A leitura da fluorescência resultante foi realizada no espectrofotômetro de fluorescência (Hitachi F-4500) usando os comprimentos de onda de excitação e emissão 500 e 536nm, respectivamente.

4-RESULTADOS

4.1-TIPOS MAJORITÁRIOS DE HEMÓCITOS E ÍNDICE DE FAGOCITOSE

Em nossos estudos utilizando microscopia óptica, encontramos dois tipos principais de células que identificamos como plasmatócitos (PI) e granulócitos (Gr). Os granulócitos foram, em geral, um pouco maiores que os plasmatócitos possuindo um núcleo pequeno em relação ao citoplasma; estas células apresentaram muitos grânulos ou vacúolos em seu citoplasma (FIGURA 3). Estas células, fixadas por metanol e coradas com Giemsa, apresentaram núcleos e citoplasmas basofílicos.

Os plasmatócitos, em geral, apresentaram núcleos grandes em relação ao citoplasma (quando comparados aos granulócitos) e poucos vacúolos (FIGURA3). Os plasmatócitos, fixados por metanol e corados com Giemsa, apresentaram núcleos eosinofílicos e citoplasmas basofílicos.

Foram analisadas 470 células obtidas de fêmeas injetadas com 1×10^6 células de *S. cerevisiae* e 508 de não injetadas (TABELA1). Detectamos 384 plasmatócitos (81,7%) e 86 granulócitos (18,3%) na população de células obtidas a partir de fêmeas injetadas e, nesta população, encontramos 91 plasmatócitos (19,4%) e 6 granulócitos (1,3%) com levedo fagocitado, resultando num índice de fagocitose de aproximadamente 20%. Para fêmeas não injetadas, encontramos 380 plasmatócitos (74,8%) e 128 granulócitos (25,2%).

FIGURA 3: Tipos celulares majoritariamente encontrados na hemolinfa, de fêmeas parcialmente ingurgitadas, do carrapato *B. microplus* observados por microscopia óptica. As células foram coletadas e colocadas sobre lâmina contendo PBS. Nas posições superiores esquerda e direita: granulócitos; na posição inferior esquerda e direita: plasmatócitos sem e com levedo fagocitado, respectivamente. Aumento:1000 vezes

TABELA 1: Quantificação de plasmatócitos (PI) e granulócitos (Gr) encontrados na hemolinfa de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapto *B. microplus* injetadas com 1×10^6 células de *S. cerevisiae* e não injetadas. Os números entre parênteses representam as porcentagens relativas à população total de hemócitos analisados.

FÊMEAS INJETADAS

	Numero de PI	Número de Gr	Número de PI + Gr
Com material fagocitado	91 (19,4)	6 (1,3)	97 (20,7)
Sem material fagocitado	293	80	373
Com e sem material fagocitado	384 (81,7)	86 (18,3)	470 (100)

FÊMEAS NÃO INJETADAS

	380 (74,8)	128 (25,2)	508 (100)
--	------------	------------	-----------

4.2-AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $\cdot\text{O}_2^-$ POR HEMÓCITOS ATRAVÉS DA REDUÇÃO DE CITOCROMO C

Nossas primeiras tentativas de detectar superóxido produzido pelos hemócitos do carrapato foram através da redução do citocromo c. Acompanhamos a variação de absorbância a 550nm durante 10 minutos de uma mistura de reação contendo 10 $\mu\text{mol/L}$ de citocromo c, 1x10⁵ hemócitos de fêmeas completamente ingurgitadas (células coletadas três dias após a queda das fêmeas do bovino), 1x10⁶ UFC de *E. coli* em tampão PBS/sac. Nenhuma variação na absorbância ocorreu durante este período. Mesmo aumentando a concentração de citocromo c para 20 e 40 $\mu\text{mol/L}$ ou usando outro estímulo (bactéria *E. cloacae*) e acompanhando a reação por um tempo maior (20 minutos), não detectamos variação significativa na absorbância. O mesmo resultado foi obtido quando se usou hemolinfa total (plasma+hemócitos) ou plasma isoladamente.

4.3-AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 POR LUMINESCÊNCIA (LUM) AMPLIFICADA POR LUMINOL

Os primeiros experimentos de luminescência foram realizados com hemócitos de fêmeas completamente ingurgitadas e que já haviam se desprendido do couro do bovino. Incubamos 1x10⁵ hemócitos na presença de 16 $\mu\text{mol/L}$ de luminol usando como estímulo 1x10⁵ ou 1x10⁶ UFC de *Micrococcus luteus* em PBS. Os valores de luminescência (expressos em unidades arbitrárias) foram detectados em espectrômetro de cintilação líquida (Beckman) com circuito de

coincidência desligado. Acompanhamos a variação da luminescência por 1 hora registrando as contagens de cada frasco de cintilação a cada intervalo de 5 minutos. Não houve variação nas contagens durante este período. Incubações contendo 15µmol/L de lucigenina ao invés de luminol apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, as contagens não mostraram qualquer sinal indicativo de aumento de luminescência. Dobrar a concentração dos amplificadores e/ou das células, ou mesmo a quantidade das bactérias não alteraram essa resposta. Usando neutrófilos de camundongos como controle, obtivemos aumento da luminescência das células estimuladas nos dois sistemas (luminol ou lucigenina), porém, os valores absolutos das contagens eram cerca de 10 vezes maior no sistema contendo luminol.

Resultados indicativos da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por células do carrapato foram obtidos, por luminescência, em experimentos onde incubamos hemolinfa total de fêmeas parcialmente ingurgitadas contendo 1×10^5 hemócitos na presença de 1×10^5 ou 1×10^6 UFC de *M.luteus* e 32µmol/L de luminol. Além da fase diferente do carrapato, outra alteração em relação aos experimentos anteriores é que usamos PBS suplementado com Ca^{+2} , Mg^{+2} e glicose (PBSS). A [FIGURA 4](#) é representativa desses experimentos onde houve maior luminescência quando incubou-se hemolinfa com 1×10^5 do que com 1×10^6 UFC. No entanto, em alguns experimentos 1×10^6 UFC resultou em maior luminescência do que com 1×10^5 UFC. As células não estimuladas apresentaram um valor de luminescência menor que o das células estimuladas. Não houve qualquer aumento da luminescência nos frascos contendo somente bactérias ou luminol. Nas mesmas condições destes experimentos mas usando hemolinfa de

FIGURA 4: Luminescência amplificada por luminol (32 $\mu\text{mol/L}$) da hemolinfa (hp) de fêmeas parcialmente ingurgitadas incubadas na presença de 1×10^5 ou 1×10^6 UFC da bactéria gram-positiva *M. luteus* durante 30 minutos.

fêmeas completamente ingurgitadas não obtivemos qualquer aumento da luminescência.

Quando realizamos experimentos com hemócitos e plasma isoladamente verificamos que hemócitos estimulados com 1×10^6 UFC de *M. luteus* produziram luminescência maior em relação aos hemócitos não estimulados. Plasma e plasma contendo bactérias não produziram qualquer luminescência (FIGURA 5).

Na FIGURA 6 estão apresentados os resultados de experimentos realizados em triplicatas, usando 1×10^6 partículas de zimosam (zim) como estímulo do "burst" oxidativo. Os valores foram obtidos a partir da média de 3 incubações distintas com hemócitos de carrapatos provenientes de uma mesma infestação. Este resultado mostra que zimosan estimulou a produção da luminescência em reação inibida parcialmente por 50U de SOD presente desde o início da incubação.

Na FIGURA 7 estão apresentados os resultados de experimentos realizados em triplicatas usando 100 ng de éster forbólico (PMA) como estímulo do "burst" oxidativo. As curvas foram construídas com valores médios de três incubações distintas com hemócitos de carrapatos provenientes de uma mesma infestação. Observamos um aumento na produção da luminescência nos hemócitos estimulados, sendo a reação parcialmente inibida por 50U de SOD. Adição de 500U de CAT após a adição de SOD reduziu a luminescência a níveis próximos aos dos controles.

Verificamos também o efeito da adição da enzima peroxidase (POX) sobre a luminescência produzida pelos hemócitos. A presença de 6U de peroxidase nos frascos contendo hemócitos e PMA desde o início da incubação fez a

FIGURA 5: Luminescência amplificada por luminol ($32 \mu\text{mol/L}$) de 1×10^5 hemócitos (hc) e plasma de fêmeas parcialmente ingurgitadas incubados na presença de 1×10^6 UFC da bactéria gram-positiva *M. luteus* durante 30 minutos.

FIGURA 6: Luminescência amplificada por luminol (32 $\mu\text{mol/L}$) de 1×10^5 hemócitos (hc) de fêmeas parcialmente ingurgitadas incubados na presença de 1×10^6 partículas de zimosan (zim) durante aproximadamente 90 minutos. Outras incubações consistiram de hemócitos e hemócitos/zimosan na presença de 50U de superóxido dismutase (SOD) desde o início da incubação. As curvas foram construídas com valores médios de três incubações simultâneas e as barras indicam o erro padrão.

FIGURA 7: Luminescência amplificada por luminol (32 $\mu\text{mol/L}$) de 1×10^5 hemócitos (hc) de fêmeas parcialmente ingurgitadas incubados na presença e ausência de 100ng de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) durante aproximadamente 90 minutos. Após 60 minutos de leitura adicionaram-se 50U de superóxido dismutase (SOD) aos frascos. Aos 75 minutos adicionaram-se 500U de catalase (CAT). As curvas foram construídas com valores médios de três incubações simultâneas e as barras indicam o erro padrão.

luminescência dobrar em relação aos hemócitos estimulados na ausência de peroxidase. Adição de 50U de SOD, após cerca de 55 minutos de incubação, reduziu parcialmente a luminescência. Novamente, 500U de CAT reduziu totalmente a luminescência em ambos os sistemas (FIGURA 8).

Nos ensaios em que usamos 20µg de lipolissacarídeo (LPS) para estimular os hemócitos não observamos um aumento da luminescência em relação a dos hemócitos não estimulados, pois a luminescência ficou próxima ao controle contendo apenas hemócitos (FIGURA 9).

Substituindo luminol por 15 µmol/L ou 50 µmol/L de lucigenina e realizando-se ensaios com os mesmos estímulos (bactérias, zimosam e PMA) e nas mesmas condições não detectamos variações da luminescência.

4.4-AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H₂O₂ PELOS HEMÓCITOS ATRAVÉS DA OXIDAÇÃO DE FENOL VERMELHO

Para cada experimento de detecção da produção de H₂O₂ pelos hemócitos através da oxidação do fenol vermelho foi construída uma curva padrão com quantidades conhecidas de peróxido de hidrogênio entre 2 a 10 nmols (exemplo de curva padrão na FIGURA 10).

A FIGURA 11 mostra os resultados dos experimentos em que se utilizaram 1x10⁶ UFC de *M. luteus* como estímulo. No tubo contendo hemócitos (hc), que não recebeu estímulo, quantificamos a produção de 2,53 ± 0,57 nmols de H₂O₂. A presença de 100U de CAT durante a incubação reduziu este valor para 1,60 ±

FIGURA 8: Luminescência amplificada por luminol (32 $\mu\text{mol/L}$) de 1×10^5 hemócitos (hc) de fêmeas parcialmente ingurgitadas incubados na presença e ausência de 100ng de PMA e 6U de peroxidase (POX) durante aproximadamente 110 minutos. Em aproximadamente 60 minutos de leitura adicionaram-se 50U de superóxido dismutase (SOD) aos frascos. Aos 80 minutos adicionaram-se 500U de catalase (CAT).

FIGURA 9: Luminescência amplificada por luminol (32 $\mu\text{mol/L}$) de 1×10^5 hemócitos (hc) de fêmeas parcialmente ingurgitadas incubados na presença e ausência de 20 μg de lipolissacarídeo (LPS) durante aproximadamente 95 minutos. Aos 60 minutos de leitura adicionaram-se 50U de superóxido dismutase (SOD) aos frascos. Aos 80 minutos adicionaram-se 500U de catalase (CAT). As curvas foram obtidas a partir do valor médio de três incubações simultâneas e as barras indicam o erro padrão.

FIGURA 10: Exemplo de curva padrão obtida usando 2, 4, 8 e 10 nmols de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A oxidação do fenol vermelho causa variação da absorvância em função da quantidade de H_2O_2 na presença de peroxidase.

FIGURA 11: Quantidade de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em nmols, medido espectrofotometricamente através de oxidação de fenol vermelho. 1×10^5 hemócitos (hc) de fêmeas parcialmente ingurgitadas foram estimulados com 5×10^5 UFC de *M. luteus* na presença e ausência de 100U de catalase (CAT). Os valores foram obtidos a partir da média de três incubações distintas e as barras indicam o erro padrão. Os níveis de H₂O₂ foram calculados a partir de curva padrão obtida paralelamente ao experimento.

0,36 nmols. Estimulando os hemócitos com bactérias detectamos $4,81 \pm 0,44$ nmols de peróxido de hidrogênio, indicando um aumento de aproximadamente 90% em relação ao nível detectado para células não estimuladas. A presença de 100 U de CAT inibiu totalmente a oxidação do fenol vermelho.

Nos experimentos em que se usou 100ng de PMA para estimular os hemócitos quantificamos $5,55 \pm 0,23$ nmols de H_2O_2 enquanto os hemócitos não estimulados produziram $3,29 \pm 0,49$ nmols. Estes resultados nos mostram que houve um aumento de aproximadamente 69% no nível de peróxido de hidrogênio produzido pelos hemócitos quando estimulados por PMA. As quantidades de H_2O_2 medidas, quando se adicionou 100U de catalase nos frascos contendo hemócitos sem e com PMA, foram respectivamente, $1,63 \pm 0,27$ e $2,02 \pm 0,28$ (FIGURA 12).

Em nenhum dos experimentos de oxidação de fenol vermelho em que empregamos lipopolissacarídeo (LPS) como estímulo para as células verificamos diferença significativa nos níveis de H_2O_2 em relação aos controles. A FIGURA 13 é representativa destes experimentos, em que usamos 20 μ g de LPS como estímulo, onde quantificamos $4,42 \pm 0,37$ nmols de H_2O_2 no sistema estimulado, valor muito próximo do medido para hemócitos não estimulados ($3,90 \pm 0,47$ nmols).

Com intenção de comprovarmos, indiretamente, a geração do ânion superóxido no sistema realizamos um experimento em que adicionamos, desde o início da incubação, 50 U de superóxido dismutase (SOD) em frascos contendo hemócitos estimulados com PMA. A presença de SOD resultou em maior oxidação do fenol vermelho, indicando a presença de $3,59 \pm 0,40$ nmols de H_2O_2 , quando

FIGURA 12: Quantidade de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em nmols, medido espectrofotometricamente através de oxidação fenol vermelho. 1×10^5 hemócitos (hc) de fêmeas parcialmente ingurgitadas foram estimulados com 100ng de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) na presença e ausência de 100U de catalase (CAT). Os valores foram obtidos a partir da média de três incubações distintas e as barras indicam erro padrão. Os níveis de H₂O₂ foram calculados a partir de curva padrão obtida paralelamente ao experimento.

FIGURA 13: Quantidade de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em nmols, medido espectrofotometricamente através de oxidação de fenol vermelho. 1×10^5 hemócitos (hc) de fêmeas parcialmente ingurgitadas foram estimulados com 20 μ g de lipolissacarídeo (LPS) na presença e ausência de 100U de catalase (CAT). Os valores foram obtidos a partir da média de três incubações distintas e as barras indicam erro padrão. Os níveis de H₂O₂ foram calculados a partir de curva padrão obtida paralelamente ao experimento.

comparado ao sistema no qual os hemócitos foram estimulados com PMA na ausência de SOD ($2,17 \pm 0,48$ nmols de H_2O_2). Este resultado mostra um aumento de cerca de 65% nos níveis de peróxido de hidrogênio responsável pela oxidação do fenol vermelho (FIGURA 14).

Para verificarmos o efeito de um inibidor de proteína quinase C (PKC) sobre o "burst" oxidativo dos hemócitos adicionamos 50 nmol/L de bisindolilmaleimida III (BIM) em frascos contendo hemócitos estimulados com PMA. A presença de BIM não alterou significativamente a oxidação do fenol vermelho, indicando a presença de $2,78 \pm 0,33$ nmols de H_2O_2 , quando comparado ao sistema no qual os hemócitos foram estimulados com PMA na ausência de BIM ($2,17 \pm 0,48$ nmols de H_2O_2) (FIGURA 15).

4.5-DETECÇÃO DE H_2O_2 POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Hemócitos estimulados com zimosan foram analisados sob microscopia para determinar a fluorescência das células e tentar correlacionar a produção de H_2O_2 com atividade fagocítica. A opção pelo uso desta técnica de detecção se fez, inicialmente, devido ao reduzido número de hemócitos necessários para as análises. Isto permitiria a realização de maior número de experimentos e, conseqüentemente, mais estudos dos mecanismos utilizados pelas células na geração de espécies reativas de oxigênio. As FIGURAS 16a, 16b e 16c mostram, respectivamente, campos representativos das lamínulas contendo hemócitos estimulados com zimosan na presença de catalase, hemócitos não estimulados e

FIGURA 14: Quantidade de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em nmols, medido espectrofotometricamente através de oxidação de fenol vermelho. 1×10^5 hemócitos (hc) de fêmeas parcialmente ingurgitadas foram estimulados com 100ng de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) na presença e ausência de 50 U de superóxido dismutase (SOD). Os valores foram obtidos a partir da média de duas incubações distintas e as barras indicam erro padrão. Os níveis de H₂O₂ foram calculados a partir de curva padrão obtida paralelamente ao experimento.

FIGURA 15: Quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em nmols, medido espectrofotometricamente através de oxidação de fenol vermelho. 1×10^5 hemócitos (hc) de fêmeas parcialmente ingurgitadas foram estimulados com 100ng de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) na presença e ausência de 50 nmol/L de bisindolilmaleimida III (BIM). Os valores foram obtidos a partir da média de duas incubações distintas e as barras indicam erro padrão. Os níveis de H_2O_2 foram calculadas a partir de curva padrão obtida paralelamente ao experimento.

FIGURA 16: Imagens, obtidas a partir de microscopia de fluorescência, de hemócitos incubados com 10 $\mu\text{mol/L}$ do fluoróforo dihidrorrodamina 123 (DHR) na presença ou ausência de 500 U de catalase. Em a, b e c visualizam-se, respectivamente, campos representativos das lamínulas contendo hemócitos estimulados com zimosan na presença de catalase, hemócitos não estimulados e hemócitos estimulados. Aumento 40 vezes.

hemócitos estimulados com zimosan. Observamos que as células estimuladas com zimosan apresentaram maior fluorescência que as células não estimuladas e a presença de catalase inibiu a fluorescência em ambas. Para cada lamínula contaram-se 100 células de campos escolhidos aleatoriamente e com as intensidades relativas de fluorescência obtidas ([TABELA 2](#)) construíram-se histogramas ([FIGURA 17](#)).

A partir dos dados, verificamos que na lamínula contendo hemócitos estimulados ocorrem 26 células com intensidade relativa de fluorescência acima de 150 unidades. Neste experimento todas as células estimuladas na presença de catalase apresentaram intensidade de fluorescência menor que 50 unidades e as não estimuladas abaixo de 100 unidades. Este resultado evidencia o envolvimento de H_2O_2 no sistema. Em outros experimentos semelhantes ao descrito acima (com zimosan ou PMA como estímulo) não obtivemos diferença entre as fluorescências das células estimuladas e não estimuladas. Creditamos esta fluorescência basal ao estresse causado pela adesão dos hemócitos à lâmina de vidro. Realizamos também experimentos em que as células foram deixadas aderirem por 30 minutos ou 24 horas à lâmina de vidro antes da adição do fluoróforo (DHR) e estímulo. Nenhuma destas alterações resultou em diferença entre as fluorescências das células estimuladas e não estimuladas. Em todas as situações a adição de catalase inibiu as fluorescências.

4.6-DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR FLUORIMETRIA

Usando a técnica fluorimétrica, analisamos as fluorescências dos hemócitos

TABELA 2: Valores das intensidades relativas de fluorescência de hemócitos não estimulados (hc) e estimulados com zimosan na presença (hc/zim/CAT) ou ausência (hc/zim) de catalase. Foram selecionadas 100 células de cada lamínula para digitalização da imagens e posterior análise. A quantificação das intensidades foi obtida a partir de programa computacional de análise de imagens (Metamorph Imaging Comp.) e são relativas ao nível da cor cinza das imagens.

INTERVALO DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA (unidades arbitrárias)	NÚMERO DE hc/zim/CAT	NÚMERO DE hc	NÚMERO DE hc/zim
0-50	100	36	20
51-100	0	64	34
101-150	0	0	20
151-200	0	0	14
201-250	0	0	12

FIGURA 17: Histogramas construídos a partir das intensidades relativas de fluorescência mostradas na TABELA 2.

de fêmeas parcialmente ingurgitadas quando estimuladas com PMA na presença de dihidrorrodamina 123 (DHR). Resolvemos utilizar mais esta técnica devido à baixa reprodutibilidade dos experimentos de microscopia de fluorescência. A **FIGURA 18** apresenta os resultados de 1×10^5 hemócitos de fêmeas parcialmente ingurgitadas estimulados com 100 ng de PMA na presença ou ausência de L-cisteína ("scavenger" de oxidantes como peróxido de hidrogênio e peroxinitrito). Os resultados mostram que houve um aumento na fluorescência de aproximadamente 42% (51 unidades de fluorescência, UF) em relação às células não estimuladas (36 UF). A adição de L-cisteína inibiu a fluorescência, tanto das células estimuladas quanto das não estimuladas até níveis basais, isto é, igual ao dos hemócitos não estimulados.

FIGURA 18: Intensidades de fluorescência de 1×10^5 hemócitos (hc) incubados por 60 minutos na presença de $5 \mu\text{mol/L}$ de dihidrorrodamina 123 (DHR). Como estímulo empregou-se 100 ng de PMA (hc/PMA). Cisteína (cys) 1mmol/L (concentração final) foi adicionada às misturas de incubação e inibiu a fluorescência tanto dos hemócitos estimulados (hc/PMA/cys) quanto dos não estimulados (hc/cys). Os valores das intensidades de fluorescência foram obtidos a partir da média de três incubações distintas e as barras indicam o erro padrão.

5-DISCUSSÃO

Nos invertebrados, os componentes da hemolinfa (plasma e hemócitos) são os responsáveis pela defesa imune, evitando a proliferação de microorganismos e parasitas na hemocele. Segundo revisão em Sonenshine (1991) o plasma, em geral, representa entre 40 e 50% da hemolinfa de carrapatos e atua como veículo de transporte para hormônios, nutrientes e produtos do metabolismo celular. Além de propiciar um ambiente osmoticamente balanceado para as células e tecidos, o plasma contém uma variedade de enzimas e fatores humorais envolvidos nas reações de defesa. Os hemócitos representam entre 50 e 60% da hemolinfa dos carrapatos e, apesar das controvérsias na nomenclatura destas células, vários autores (segundo Sonenshine, 1991) concordam com a existência de pelo menos cinco classes de hemócitos: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos (tipos I e II), esferulócitos e oenocitóides. Esta classificação foi proposta por Binnington & Obenchain (1982) e se baseou no sistema utilizada por Jones (1977) para os insetos. Existe uma considerável variação na classificação e nomenclatura das células presentes na hemolinfa de carrapatos: todos os autores, segundo Sonenshine (1991), reconhecem os prohemócitos (células das quais todos os outros tipos se diferenciam) e plasmatócitos (células com atividade fagocítica). As células que contêm abundantes corpos de inclusão são chamados granulócitos por alguns e esferulócitos por outros (Sonenshine, 1991).

De acordo com Dolp (1970) e Brinton & Burgerdorfer (1971) os plasmatócitos são os tipos celulares mais comuns na hemolinfa de adultos de ixodídeos. No entanto, os recentes estudos realizados por Carneiro & Daemon

(1997) mostraram que os esferulócitos superaram em número os plasmatócitos em fêmeas do ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*. Nos estudos realizados por Kuhn e Haug (1994) com o carrapato *Ixodes ricinus*, foram encontrados cerca de 20% de plasmatócitos e 80% de granulócitos (20% tipo I e 60% tipo II). Estes autores classificaram os hemócitos com base em sua ultraestrutura, habilidade para ingerir materiais e estocar moléculas de defesa. A ultraestrutura dos plasmatócitos no carrapato *Ixodes ricinus* se assemelhou muito com a descrita para plasmatócitos de insetos (Brehélin & Zachary, 1986), células hialinas de crustáceos (Hose *et al.*, 1990) e as células agranulares do quelicetata *Tachypleus* (Jacobsen & Suhr-Jessen, 1990). Estas células apresentam abundantes lisossomos e diferentes comportamentos na capacidade de ingerir materiais: ingerem bactérias mas não partículas abióticas (partículas de látex). Kuhn & Haug (1994) observaram que os granulócitos tipo I foram as primeiras células a apresentarem alterações morfológicas após introdução de material invasor no carrapato *Ixodes ricinus* e também apresentaram atividade fagocítica, porém, diferentemente dos plasmatócitos, ingeriram igualmente bactérias e partículas de látex. Além da capacidade de fagocitar materiais, supõe-se que estas células estejam envolvidas no processo de coagulação em carrapatos (Eggenberger *et al.*, 1990). Os granulócitos tipo II parecem estar envolvidos no estoque, transporte e metabolismo de glicogênio, além de contribuir na resposta humoral contra bactérias, já que mostraram imunoreatividade com lisozima (Kuhn & Haug, 1994). Comparativamente, os granulócitos em moluscos possuem pequenos grânulos (0,2-0,3 µm) basofílicos e grandes grânulos (0,5-1,5 µm) eosinofílicos. Os grânulos

grandes contêm enzimas hidrolíticas como proteases, glicosidases, sulfatases, peroxidase e fenoloxidase e, durante a fagocitose, estas células produzem espécies reativas de oxigênio (Pipe *et al.*, 1997).

Através de microscopia óptica detectamos dois tipos de células presentes na hemolinfa do carrapato bovino *B. microplus*, os quais chamamos de plasmatócitos e granulócitos. Os plasmatócitos foram as células mais abundantes (cerca de 82%) e as principais responsáveis pela fagocitose de *S. cerevisiae in vivo*. Esta proporção não foi diferente para carrapatos não injetados, o que nos leva a concluir que, nas condições do ensaio (3,5 h após inoculação), não houve recrutamento de células fagocíticas. O aumento do número de hemócitos após infecção em carrapatos foi demonstrado para argasídeos (Kryucheynikov, 1991) e ixodídeos (Johns *et al.*, 1998), onde o número máximo de hemócitos presentes na hemolinfa foi atingido em 48 h após a infecção com bactérias. Paralelamente ao aumento do número de hemócitos ocorreu diminuição das bactérias injetadas na hemolinfa dos carrapatos.

Estudando encapsulação da vespa parasita *Leptopilina boulardi* por células do díptero *Drosophila melanogaster*, Nappi *et al.* (1995) verificaram que os plasmatócitos foram as células envolvidas no processo de encapsulação do parasita. Em outros insetos também têm se verificado que os plasmatócitos (ou células com descrições semelhantes) são as células mais abundantes na hemolinfa e relacionadas com fagocitose (Lanz *et al.*, 1993; Nappi & Vass, 1998; Hernandez *et al.*, 1999) como detectamos para o carrapato *B. microplus*.

Como a classificação de hemócitos baseada em aspectos morfológicos visualizados por microscopia óptica é precária, pretendemos realizar futuros

estudos de caracterização dos hemócitos do carrapato *B. microplus* por microscopia eletrônica.

Nossos resultados mostraram que há envolvimento do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio na luminescência amplificada com luminol, pois a luminescência é inibida quando adicionamos SOD e posteriormente CAT. Quando uma destas enzimas está presente desde o início das incubações também ocorre inibição.

A geração de ERO parece estar relacionada à fase de vida do carrapato, pois nenhuma luminescência foi detectada quando se usou hemolinfa ou hemócitos advindos de fêmeas completamente ingurgitadas e com três dias após a queda do bovino. Todos os resultados de produção de ERO foram obtidos com hemolinfa de fêmeas parcialmente ingurgitadas. Há relatos que o estado fisiológico do animal ou fatores climáticos na época em que se faz coleta da hemolinfa pode influenciar na produção de ERO pelos hemócitos (Collazos *et al.*, 1995; Noel *et al.*, 1993).

A luminescência medida está associada aos hemócitos e não ao plasma, pois ao realizarmos ensaios com estes componentes separadamente, só as misturas de reação contendo hemócitos elicitarão luminescência. Este resultado mostra que a ausência de fatores plasmáticos opsonizantes não influenciaram na produção de ERO. Não sabemos se a ausência destes fatores influenciaram nos índices de fagocitose, embora se saiba, através de alguns estudos em moluscos, que sua presença pode aumentar a eficácia no reconhecimento de materiais invasores (Fryer & Bayne, 1989). Além disto, há relatos de produção de ERO por hemócitos isolados (Anderson, 1994; Pipe *et al.*, 1997).

O uso de luminescência amplificada por luminol tem sido largamente usada para detecção de espécies reativas de oxigênio em outros grupos de invertebrados. Em moluscos, o grupo de invertebrados mais estudado em relação à produção de ERO, a luminescência amplificada por luminol foi usada em bivalves (Anderson, 1994) e em caramujos (Dikkeboom *et al.*, 1987 e 1988). Nesses estudos, onde se usaram concentrações de células entre 10^5 e 10^6 células por mL, se detectou aumento de luminescência empregando-se zimosam, bactérias, partículas de látex e PMA para estimular o “burst” oxidativo. Estes autores também mostraram que altas concentrações de zimosam ou bactérias nas misturas de reação podem “bloquear” parte da luminescência. Além disto, discutem que a hemoglobina presente absorve a luz emitida por luminol, enquanto hemocianina não interfere. No caso do carrapato *B. microplus* a principal hemoproteína presente no plasma (Maya-Monteiro *et al.*, 2000) não interfere na luminescência, já que tanto hemolinfa quanto hemócitos isolados apresentaram os mesmos níveis de luminescência.

Tem sido reportado que a atividade fagocítica das células é aumentada na presença de cátions divalentes como Ca^{+2} e Mg^{+2} . Acredita-se que estes íons estejam envolvidos no processo de reconhecimento de açúcares, presentes na membrana de microorganismos invasores, por lectinas presentes na superfície de células fagocíticas. O aumento do índice de fagocitose de leveduras *S. cerevisiae* por células da ascídia *Botryllus schlosseri* foi verificado na presença destes íons, sendo o magnésio mais efetivo para promover a fagocitose (Ballarin *et al.*, 1994). Por esta razão usamos tampão PBS suplementado com estes íons e glicose, simulando um ambiente mais próximo do fisiológico e adequado para ocorrência

de fagocitose e, conseqüentemente, o "burst" oxidativo.

A adição de glicose às misturas de reação, em nossos experimentos, foi importante para a obtenção de luminescência. Este resultado pode significar atividade da via metabólica de hexose durante o "burst" oxidativo, de modo semelhante ao que ocorre nos mamíferos. A dependência de glicose para a produção de superóxido também foi verificada em estudos dos hemócitos do crustáceo *Carcinus maenas* por Bell & Smith (1993), onde as células falharam em produzir este ânion quando não se adicionou glicose ao meio de incubação.

Em alguns experimentos de luminescência usando bactérias como estímulos não observamos diferenças entre as células estimuladas e as não estimuladas, mesmo variando-se o número de bactérias e/ou espécie. Acreditamos que este fato ocorreu devido às células já estarem ativadas e, portanto, adição de estímulo externo não afetou significativamente sua resposta imune. Esta ativação pode estar relacionada a fatores como saúde do bezerro hospedeiro e/ou contaminação por microorganismos da cutícula do carrapato. Para tentar minimizar este problema efetuou-se a coleta de hemolinfa sob condições estéreis: lavamos rapidamente os carrapatos com etanol 70%, coletou-se a hemolinfa em fluxo laminar e manipulamos as células cuidadosamente procurando ressuspendê-las agitando suavemente o "eppendorf". Mesmo adotando este procedimento os resultados persistiram, ou seja, não se observou diferença na luminescência produzida pelos hemócitos estimulados e não estimulados.

Tanto bactérias quanto zimosam e PMA estimularam os hemócitos a produzirem espécies reativas de oxigênio. Este resultado sugere, baseado nos

estudos em vertebrados, que há pelo menos dois tipos de mecanismos responsáveis pela produção de ERO pelos hemócitos de carrapatos. Nos vertebrados, PMA atravessa a membrana celular e, mimetizando diacilglicerol, ativa diretamente a proteína quinase C (PKC). A ativação desta enzima é um importante passo no mecanismo de formação de NADPH oxidase na membrana, pois este complexo é funcional quando proteínas citossólicas fosforiladas são translocadas até a membrana plasmática. Já material particulado, como zimosam e bactérias, deve antes interagir com receptores de membrana que por sua vez ativam as fosfolipases C e D (PLC e PLD) em um processo mediado por uma proteína G trimérica. Só depois disto é que ocorre ativação da PKC (Morel *et al.*, 1991).

Durante o processo de internalização do material que está sendo fagocitado, o ânion superóxido está sendo gerado para o exterior das células e pode ser eliminado pela enzima SOD. A redução apenas parcial da luminescência após a adição de SOD pode significar remoção apenas deste superóxido externo, já que SOD não atravessa as membranas celulares. A luminescência remanescente pode ser creditada ao fato do luminol atravessar as membranas celulares e detectar superóxido gerado internamente (Muller-Peddinghaus, 1984; Dahlgren *et al.*, 1988; Samuni *et al.*, 1991; Dahlgren & Karlsson, 1999).

Outra explicação possível para esta redução parcial é considerar a luminescência remanescente como resultado de um balanço entre a diminuição de superóxido externo gerado pelas células e o aumento deste ânion devido à reação de luminol oxidado com oxigênio molecular. A formação deste luminol oxidado é favorecida devido a adição de SOD elevar os níveis de H_2O_2 no sistema que,

juntamente com peroxidase, oxida o luminol, gerando o radical luminol (Faulkner & Fridovich, 1993). De fato, em alguns poucos experimentos houve aumento da luminescência após a adição de SOD, indicando que neste casos, a quantidade de superóxido gerado a partir do luminol superou o eliminado pela enzima.

A formação de peróxido de hidrogênio, produto da dismutação de íons superóxido em reação catalisada ou não, pode ser uma indicação indireta da produção de íons superóxido pelo sistema. Tem sido reportado que a reatividade química do composto H_2O_2 em sistemas é relativamente baixa, porém, duas características contribuem para o aumento de sua reatividade: a capacidade de atravessar membranas biológicas e de poder dar origem ao radical hidroxil (Cadenas, 1995). A adição de catalase no início das incubações ou após algum tempo provocou inibições mais significativas da luminescência amplificada por luminol que adição da SOD. Interpretamos este resultado como indicativo de que o composto peróxido de hidrogênio estava contribuindo significativamente para a luminescência. Esta contribuição do peróxido de hidrogênio fica evidente no experimento em que se adicionou peroxidase ao sistema ([FIGURA 9](#)). No experimento contendo peroxidase adicional a luminescência obtida foi cerca de duas vezes maior em relação às células estimuladas com PMA na ausência de peroxidase externa, sugerindo que peroxidase e não peróxido de hidrogênio estaria limitando o sinal. Isto significa que há formação de grande quantidade de H_2O_2 , porém, a detecção é dependente de peroxidase. Deste resultado pode se especular que os níveis de peroxidase intrínseca dos hemócitos dos carrapatos são relativamente baixos. Variações no nível de peroxidase em hemócitos já foi verificada em diferentes espécies de moluscos por Adema *et al.* (1992). Estes

autores mostraram que os hemócitos do molusco *Achatina achatina* apresentaram 96% de reatividade com diaminobenzidina (corante usado na detecção de atividade peroxidase) enquanto hemócitos de *Achatina fulica* não mostrou reatividade, embora os índices de fagocitose verificado para ambos fossem iguais. Mesmo com atividade fagocítica semelhante os níveis de luminescência amplificada por luminol relacionaram-se diretamente com a atividade peroxidase. Adicionalmente, podemos interpretar que o aumento da luminescência amplificada por luminol nos nossos experimentos, após a adição de peroxidase, seja devida à contribuição de íons hipohalosos, e.g. ClO^- , formados a partir da oxidação de íons haletos presentes no sistema, já que estes íons elicitam luminescência.

Nos experimentos de luminescência usando LPS como estímulo não houve diferença entre as células estimuladas e não estimuladas. Este é um resultado intrigante pois, sendo o LPS o principal componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, o esperado seria que ocorresse ativação do sistema NADPH-oxidase, com consequente produção de ERO. Resultados em nosso laboratório mostram a ausência de atividade antibacteriana na hemolinfa do carrapato contra bactérias Gram-negativas mas evidenciam atividade contra bactéria Gram-positivas e fungos (Fogaça *et al.*, 1999). Lipopolissacarídeo (LPS) é reconhecido por receptores de células de defesa em praticamente todos os organismos. Após reconhecimento pelas células ocorre liberação de várias substâncias citotóxicas (entre elas, espécies reativas de oxigênio). O mecanismo pelo qual LPS ativa o complexo NADPH-oxidase de células fagocíticas ainda é pouco conhecido em invertebrados, porém, estudos com leucócitos de vertebrados mostraram que há uma proteína de soro (LBP) que se liga

previamente ao LPS, funcionando como opsonina. A formação prévia deste complexo LPS-LBP aumenta enormemente a atividade de reconhecimento por parte dos macrófagos (Wright, 1991). Recentemente, DeLeo *et al.* (1998) trabalhando com neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) humanos mostraram que LPS induz a translocação do fator citossólico flavocitocromo b_{558} (componente do complexo NADPH-oxidase) até a membrana plasmática. Os autores mostraram que somente LPS não foi suficiente para estimular os neutrófilos, mas a produção de superóxido foi aumentada em células estimuladas com fMLP, após pré-incubação com LPS. Esses autores sugerem, então, que LPS modula a formação do complexo NADPH-oxidase. Diante disso, podemos sugerir que nossos resultados negativos com LPS sejam devido: 1) aos hemócitos carecerem de receptores para LPS e, portanto, as bactérias Gram-negativas seriam eliminadas através de outro mecanismo ; 2) haver dependência de proteínas com função de opsoninas no plasma e que são inativadas em nosso sistema “in vitro”.

Usando lucigenina não obtivemos nenhuma variação da luminescência nas mesmas condições em que se obteve usando luminol, mesmo aumentando o número de células ou variando a concentração de lucigenina. Uma possibilidade, para justificar este resultado, é que o nível de superóxido produzido pelos hemócitos estaria abaixo do limite de detecção no sistema lucigenina em nosso aparelho, já que dependendo do sistema os valores absolutos da luminescência amplificada por lucigenina é menor que luminol (Muller-Peddinghaus, 1984).

Não detectamos íons superóxido produzido pelas células do carrapato através de reações de redução do citocromo c. Acreditamos que alguns aspectos podem ter contribuído para esta não detecção. Estes experimentos foram

realizados com hemolinfa coletada três dias após a queda das fêmeas. Carrapatos nesta fase foram, inicialmente usados, devido à obtenção de maior quantidade de hemolinfa em relação às fêmeas parcialmente ingurgitadas. Atualmente sabemos que nesta fase as células são mais frágeis e sofrem lise no processo de centrifugação, além disto, os riscos de contaminações com conteúdo intestinal (sangue bovino) durante a coleta de hemolinfa são maiores. Além disto, nesta fase o carrapato está no final da vida e, portanto, a população de células fagocíticas e/ou o estado fisiológico das células pode ter influenciado nos resultados. A hipótese de que substâncias antioxidantes presentes no plasma (heme proteína, por exemplo) poderiam estar funcionando como "scavengers" do ânion superóxido foi descartada quando se realizaram experimentos com hemócitos isolados e, mesmo assim, não se observou redução do citocromo c. Há controvérsias na literatura sobre a interferência do peróxido de hidrogênio na determinação de íons superóxido por redução do citocromo c. Trabalhando com hemócitos de crustáceos, Bell & Smith (1993), detectaram aumento na redução do citocromo c após adição de catalase ao meio de incubação, evidenciando que o peróxido de hidrogênio originado a partir da dismutação do íon superóxido estavam reoxidando citocromo c e, desta forma, interferindo nos resultados. Por outro lado Adema *et al* (1991) não encontraram diferenças entre os níveis de superóxido detectado por redução de citocromo c na presença ou ausência de catalase. Pode ser que não detectamos redução do citocromo c devido a interferências do H₂O₂ no sistema.

A investigação da produção das espécies reativas de oxigênio usando outras metodologias como oxidação de fenol vermelho e microscopia de fluorescência se deveu ao fato de vários problemas serem apontados na detecção

por luminescência amplificada por luminol (Fridovich, 1997)

Os resultados dos experimentos de oxidação do fenol vermelho mostram que há, realmente, um aumento significativo (72% em média) no nível de H_2O_2 produzido pelos hemócitos mediante estímulo com a bactéria *M. luteus* e PMA. Esta reação foi inibida por CAT, sendo detectada uma redução de, em média, 47% em relação aos hemócitos estimulados na ausência de CAT. O método de oxidação de fenol vermelho já foi utilizado por vários autores para demonstrar a produção de peróxido de hidrogênio por hemócitos de invertebrados. Adema *et al.* (1991) quantificaram H_2O_2 por este método e encontraram valores entre 1,7 e 3 nmol/L do peróxido para $2,4 \times 10^5$ hemócitos do molusco *Lymnaea stagnalis* estimulados com zimosam. Zimosam também foi usado como estímulo para a produção de H_2O_2 pelos hemócitos do crustáceo *Penaeus monodon*, onde os níveis de H_2O_2 detectados por este método foi da ordem de $\mu\text{mol/L}/10^7$ células (Song & Hsieh, 1994). Estes autores discutem que os níveis de H_2O_2 encontrados no crustáceo se assemelham aos encontrados para macrófagos de peixes, mas são menores que neutrófilos e monócitos humanos. Estudando o molusco *Patinopecten yessoensis*, Nakamura *et al.* (1985) encontraram níveis de H_2O_2 entre 1,79 e 3,59 $\mu\text{mol/L}$ porém, o substrato fenólico usado foi o ácido homovanílico (HVA) e o estímulo foram as bactérias *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Arthrobacter sp.* Em nossos estudos encontramos concentrações de H_2O_2 entre 1 e 6 $\mu\text{mol/L}$ para 10^5 hemócitos por mL de mistura de reação usando como estímulo PMA ou bactéria. LPS não ativou os hemócitos, corroborando os resultados obtidos nos experimentos de luminescência.

Nos nossos experimentos em que se adicionou superóxido dismutase ao meio de incubação o nível de peróxido de hidrogênio quantificado foi maior indicando, indiretamente, a produção de íons superóxido pelos hemócitos do carrapato. Este resultado confirma, especificamente, a produção de íons superóxido pelos hemócitos, sendo importante devido a algumas críticas que são feitas sobre a determinação destes íons por luminescência amplificada por luminol, uma vez que dependendo das condições do sistema, o próprio luminol pode gerar íons superóxido: após oxidação por H_2O_2 /peroxidase o ânion luminol originado reage com oxigênio molecular formando superóxido (Faulkner & Fridovich, 1993). Kettle *et al.* (1994) demonstraram que para detecção acurada de peróxido de hidrogênio em sistemas biológicos por meio de oxidação de substratos fenólicos é necessário adicionar SOD ao meio de incubação. A adição desta enzima promove a dismutação dos íons superóxido em H_2O_2 e permite avaliar melhor os níveis produzidos no sistema. Semelhantemente, empregando-se fenol vermelho para detecção e quantificação de H_2O_2 pelos hemócitos do molusco *Mytilus edulis*, Pipe *et al.* (1992) verificaram que a adição de SOD às misturas de reação causou aumento nos níveis de H_2O_2 medidos.

Usando bisindolilmaleimida III como inibidor da proteína quinase c (PKC), não observamos redução nos níveis de oxidação do fenol vermelho. A razão de não detectarmos inibição da produção de ERO com inibidor de PKC permanece desconhecida. Futuros estudos serão realizados para se analisar a participação desta enzima no mecanismo de formação de ERO em carrapatos *B. microplus*.

Recentemente, alguns trabalhos vêm relatando o uso de microscopia de fluorescência para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio por células

através do uso do marcadores fluorescentes como diclorodihidrofluoresceína (DCDHF) e dihidrorrodamina (DHR) (Nappi & Vass, 1998a; Szucs *et al.*, 1998). DHR inicialmente foi descrito como detector de H_2O_2 em meios intracelulares, pois ao atravessar membranas e interagir com H_2O_2 forma rodamina, composto fluorescente que fica retido dentro das células (Henderson & Chappell, 1993). Analisamos, através de microscopia, a fluorescência intracelular dos hemócitos estimulados na presença de DHR para correlacionar com a produção de H_2O_2 . Na análise das imagens obtidas encontramos células com diferentes intensidades de fluorescência, mas raramente pudemos correlacionar estas intensidades com fagocitose de zimosam, pois foi difícil visualizar estas partículas internalizadas nas células. Pensamos em usar *S. cerevisiae*, células maiores e que sabemos serem fagocitadas pelos hemócitos, mas testes prévios mostraram que as intensidades de fluorescência destas células eram maiores que a dos hemócitos e poderiam, portanto, mascarar os resultados. Em um dos experimentos verificamos que na preparação de hemócitos estimulados houve um aumento no número de células com maior intensidade de fluorescência. Esta fluorescência foi inibida por catalase. Sabemos que catalase não atravessa as membranas celulares, mas acreditamos que a inibição obtida em nosso experimento pode ser devida ao estabelecimento de um fluxo de H_2O_2 do meio intracelular para o extracelular ou à entrada de catalase nas células durante o processo de fagocitose. A inibição da oxidação de marcadores fluorescentes intracelulares por catalase, adicionada ao meio de incubação, analisada por microscopia é controversa. Nappi & Vass (1998a) estudando a produção de H_2O_2 por hemócitos infectados de *D. melanogaster* detectaram inibição da oxidação do marcador DCDHF por catalase

adicionada ao meio de incubação. Szucs *et al.* (1998), analisando imagens de neutrófilos humanos, estimulados com forbol 12,13 dibutirato (PDBu) na presença de DHR, não detectaram inibição pela adição de catalase. Henderson & Chappell (1993), também analisando imagens de microscopia, somente detectaram inibição da oxidação de DHR intracelular por catalase quando acrescentaram quantidades sublétricas de TRITON X-100 0,2% à suspensão de neutrófilos.

Um problema que verificamos nos experimentos de microscopia de fluorescência foi um elevado número de células que apresentavam fluorescência mesmo na ausência de estímulos. Acreditamos, que isso ocorreu devido ao estresse causado pela adesão dos hemócitos nas lamínulas de vidro. Deixar as células aderirem às lamínulas por 30 minutos na presença de CAT para só depois adicionar os outros reagentes (DHR e zimosam) não foi suficiente para diminuir essa fluorescência basal. Mesmo a incubação das células por até 24 horas antes de adicionar o estímulo não reduziu essa fluorescência. Alteramos outros parâmetros experimentais tais como: número de partículas e/ou opsonização prévia do zimosam com plasma do carrapato. Mesmo com a introdução destas modificações não se detectou uma diferença significativa entre os hemócitos estimulados e não estimulados, o que sugeriu que a ausência de fatores opsonizantes e a relação zimosam/hemócitos não influenciaram nos resultados. Mesmo a substituição do estímulo para PMA não refletiu em um aumento da fluorescência das células estimuladas em relação às não estimuladas. Estudando a redução de NBT por hemócitos do molusco *Lymnaea stagnalis*, Dikkeboom *et al.* (1987) mostraram que a própria adesão dos hemócitos ao vidro também causou redução de NBT, evidenciando que níveis basais de produção de ERO pode estar

associado às manipulações das células devido a metodologia empregada. Diante de resultados não reproduzíveis usando microscopia de fluorescência, resolvemos usar fluorimetria para estudar a oxidação "in vitro" de DHR. Nesta técnica as incubações foram realizadas em tubos "eppendorf", da mesma forma que nos experimentos de oxidação de fenol vermelho, onde detectamos a produção de peróxido de hidrogênio nas células estimuladas com zimosam. Assim, estaríamos reduzindo as interferências devido ao estresse de adesão dos hemócitos.

Resultados de estudos por fluorimetria têm evidenciado que DHR também é oxidado pelo composto peroxinitrito, produto da reação entre óxido nítrico e superóxido (Szabo *et al.*, 1995; Gagnon *et al.*, 1998; Hempel *et al.*, 1999). Foi demonstrado por Kooy *et al.* (1994) que, em sistemas não biológicos, urato e cisteína inibem a oxidação de DHR por peroxinitrito *in vitro*. Em nosso experimento de fluorimetria obtivemos um aumento na fluorescência dos hemócitos estimulados com PMA, cuja reação foi inibida por cisteína. A oxidação de DHR pode ter sido causada por H₂O₂-peroxidase ou por peroxinitrito, sendo inibida por cisteína nos dois casos, e ainda não podemos avaliar qual a contribuição de cada composto.

Ressalta-se que os resultados foram obtidos a partir de uma população heterogênea de células da hemolinfa do carrapato. Em geral, para se detectar ERO em células fagocíticas de vertebrados ou outros invertebrados previamente se faz separação dos tipos celulares por gradiente de densidade ou trabalha-se somente com células aderentes ao vidro, que são as que possuem atividade fagocítica. Em nosso caso isto seria inviável devido à quantidade necessária de carrapatos para obter hemócitos da ordem de 10⁶ ou mais para realizarmos os

experimentos.

Algumas considerações podem se feitas quanto à produção de espécies reativas de oxigênio pelas células de defesa de um determinado organismo. Íons superóxido e peróxido de hidrogênio individualmente não são oxidantes muito reativos, entretanto, de particular importância é o fato que ambos podem reagir com óxido nítrico (NO), um radical frequentemente produzido em associação com $\cdot\text{O}_2^-$. A partir da reação entre $\cdot\text{O}_2^-$ e $\cdot\text{NO}$ forma-se peroxinitrito (ONOO^-), um poderoso agente oxidante com fortes implicações no sistema de defesa contra organismos invasores (revisão em MacMicking *et al.*, 1997). Por outro lado, foi recentemente demonstrado que da interação entre H_2O_2 e NO forma-se o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), a mais citotóxica espécie reativa de oxigênio (Nappi & Vass, 1998b). O radical hidroxil também pode se formar a partir das reações de Fenton e/ou Haber-Weiss:

Pretendemos investigar se os hemócitos de carrapato produzem óxido nítrico, uma vez que a produção deste composto foi demonstrado em hemócitos do limulídeo *Limulus polyphemus* (Radomski *et al.*, 1991 citados em Wieske & Wiesner, 1999), do molusco *Viviparus ater* (Conte & Ottaviani, 1995) e do inseto *Estigmene acraea* (Wieske & Wiesner, 1999).

Além do caráter citotóxico das espécies reativas de oxigênio é de particular

importância sua participação nos mecanismos de transdução de sinal em células vegetais (Levine *et al.*, 1994) e animais (Baeuerle *et al.*, 1996). Há evidências de que ERO, em particular H_2O_2 , atuam como mensageiros secundários ou ativadores do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), um fator de transcrição associado com a resposta imune e inflamatória de vertebrados (Schreck *et al.*, 1992; Burdon, 1995; Khan & Wilson, 1995; Schmidt *et al.*, 1996). Em *Drosophila* se sabe que a indução da transcrição de genes codificadores de peptídeos antimicrobianos é regulada por proteínas que exibem alta homologia com NF- $\kappa\beta$ de mamíferos (revisão em Hoffmann *et al.*, 1999).

Nosso conjunto de resultados mostram que as células da hemolinfa do carrapato *Boophilus microplus* apresentam, na resposta imunológica, um comportamento semelhante às dos vertebrados e de outros invertebrados como crustáceos, insetos e moluscos no que se refere à produção de espécies reativas de oxigênio. No entanto, este é o primeiro relato da produção de ERO por células de aracnídeos.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adema, C. M., Harris, R. A., & van Deutekom-Mulder, E. C. (1992). A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects. *J Invertebr Pathol* **59**, 24-32.
- Adema, C. M., van Deutekom-Mulder, E. C., van der Knaap, W. P., Meuleman, E. A., & Sminia, T. (1991). Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. *Dev Comp Immunol* **15**, 17-26.
- Adema, C. M., van Deutekom-Mulder, E. C., van der Knaap, W. P., & Sminia, T. (1994). Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. *Parasitology* **109**, 479-85.
- Akita, N., & Hoshi, M. (1995). Hemocytes release phenoloxidase upon contact reaction, an allogeneic interaction, in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Cell Struct Funct* **20**, 81-7.
- Allen, R. C. (1986). Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol* **133**, 449-93.
- Amaral, N. K., Monmany, L. F., & Carvalho, L. A. (1974). Acaricide AC 84,633: first trials for control of *Boophilus microplus*. *J Econ Entomol* **67**, 387-9.
- Anderson, R. S. (1994). Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Dev Comp Immunol* **18**, 89-96.
- Andreu, D., & L. Rivas. 1998. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Pept Sci* **47**: 415-433.
- Angus, B. M. (1996). The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *Int J Parasitol* **26**, 1341-55.
- Arakawa, T. (1994). Superoxide generation in vitro in lepidopteran larval haemolymph. *Journal of Insect Physiology* **40**, 165-171.
- Ashida, M. & Brey, P. T. (1998). Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey, P. & Hultmark, D. (Eds). Molecular mechanisms of immune response in insects, Chapman & Hall, New York, pp. 135-172.
- Augusto, O., Linares, E., & Giorgio, S. (1996). Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* **29**, 853-62.

- Baeuerle, P. A., Rupec, R. A., & Pahl, H. L. (1996). Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol Biol (Paris)* **44**, 29-35.
- Ballarin, L., Cima, F., & Sabbadin, A. (1994). Phagocytosis in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev Comp Immunol* **18**, 467-81.
- Bayne, C. J., & S. E. Fryer. 1994. Phagocytosis and invertebrate opsonins in relation to parasitism. *Ann N Y Acad Sci* **712**: 162-77.
- Bell, K. L., & Smith, V. J. (1993). In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Dev Comp Immunol* **17**, 211-9.
- Binnington, K. C. & Obenchain, F. D. (1982). Structure and fuction of the circulatory, nervous, and neuroendocrine systems of ticks. pp. 351-398. *In*: Obenchain, F.D. & Galun, R. (Eds) Physiology of Ticks. Pergamon Press, Oxford
- Boman, H. G. (1991). Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* **65**, 205-7.
- Boman, H. G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* **13**, 61-92.
- Brehélin, M. & Zachary, D. (1986). Insect hemocytes: a new classification to rule out the controversy. *In*: Brehélin, M. (ed). Immunity in invertebrates. *Springer, Heidelberg*, pp 36-48
- Brey, P. T., Lee, W. J., Yamakawa, M., Koizumi, Y., Perrot, S., Francois, M., & Ashida, M. (1993). Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6275-9.
- Brinton, L. P., & Burgdorfer, W. (1971). Fine structure of normal hemocytes in *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari:Ixodidae). *J Parasitol* **57**, 1110-27.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P., & Osborn, R. W. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol* **108**, 1353-8.
- Brunelli, L., Crow, J. P., & Beckman, J. S. (1995). The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **316**, 327-34.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., & Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol* **23**, 329-44.
- Burdon, R. H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* **18**, 775-94.

Cadenas, E. (1995). Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. pp 18-25. In: Ahmad, S. (ed) Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. *Chapman & Hall, New York*

Carneiro, M. E., & E. Daemon. 1997. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Ixodoidea: Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. *Rev Bras Parasitol* **6**: 1-9.

Cociancich, S., Goyffon, M., Bontems, F., Bulet, P., Bouet, F., Menez, A., & Hoffmann, J. (1993). Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem Biophys Res Commun* **194**, 17-22.

Collazos, M. E., Barriga, C., & Ortega, E. (1995). Seasonal changes in phagocytic capacity and superoxide anion production of blood phagocytes from tench(*Tinca tinca*,L.). *Journal of Comparative Physiology* **165**, 71-76.

Conte, A., & Ottaviani, E. (1995). Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *FEBS Lett* **365**, 120-4.

Daffre, S., Kylsten, P., Samakovlis, C., & Hultmark, D. (1994). The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol Gen Genet* **242**, 152-62.

Dahlgren, C. 1988. Effects on extra- and intracellularly localized, chemoattractant-induced, oxygen radical production in neutrophils following modulation of conditions for ligand-receptor interaction. *Inflammation* **12**: 335-49.

Dahlgren, C., & Karlsson, A. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* **232**, 3-14.

Decker, H., & Rimke, T. (1998). Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J Biol Chem* **273**, 25889-92.

DeLeo, F. R., Renee, J., McCormick, S., Nakamura, M., Apicella, M., Weiss, J. P., & Nauseef, W. M. (1998). Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest* **101**, 455-63.

Denicola, A., Rubbo, H., Rodriguez, D., & Radi, R. (1993). Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys* **304**, 279-86.

Dikkeboom, R., Tijnagel, J. M., Mulder, E. C., & van der Knaap, W. P. (1987). Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. *J Invertebr Pathol* **49**, 321-31.

Dikkeboom, R., van der Knaap, W. P., van den Bovenkamp, W., Tijnagel, J. M., & Bayne, C. J. (1988). The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of

different snail species. *Dev Comp Immunol* **12**, 509-20.

Dolp, R. M. (1970). Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Qualitative and quantitative studies of hemocytes. *J Med Entomol* **7**, 277-88.

Eggenberger, L. R., Lamoreaux, W. J., & Coons, L. B. (1990). Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. *Exp Appl Acarol* **9**, 279-87.

Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Goyffon, M., Fehlbaum, P., Hoffmann, J. A., van Dorsselaer, A., & Bulet, P. (1996). Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J Biol Chem* **271**, 29537-44.

Faulkner, K., & Fridovich, I. (1993). Luminol and lucigenin as detectors for O_2^- . *Free Radic Biol Med* **15**, 447-51.

Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Arch Insect Biochem Physiol* **29**, 187-97.

Fogaca, A. C., da Silva, P. I., Jr., Miranda, M. T., Bianchi, A. G., Miranda, A., Ribolla, P. E., & Daffre, S. (1999). Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem* **274**, 25330-4.

Fridovich, I. 1997. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* **272**: 18515-7.

Fryer, S. E., & Bayne, C. J. (1989). Opsonization of yeast by the plasma of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda): a strain-specific, time-dependent process. *Parasite Immunol* **11**, 269-78.

Gagnon, C., Leblond, F. A., & Filep, J. G. (1998). Peroxynitrite production by human neutrophils, monocytes and lymphocytes challenged with lipopolysaccharide. *FEBS Lett* **431**, 107-10.

Gonzales, J. C. (1995). O controle do carrapato do boi. 2ª edição, Porto Alegre

Graham, O. H., & Hourrigan, J. L. (1977). Eradication programs for the arthropod parasites of livestock. *J Med Entomol* **13**, 629-58.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1989). Free radicals in biology and medicine, 2nd edn. *Clarendon Press, Oxford*

Hempel, S. L., Buettner, G. R., O'Malley, Y. Q., Wessels, D. A., & Flaherty, D. M. (1999). Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol*

Med **27**, 146-59.

Henderson, L. M., & Chappel, J. B. (1996). NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta* **1273**, 87-107.

Henderson, L. M., & Chappell, J. B. (1993). Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur J Biochem* **217**, 973-80.

Hernandez, S., Lanz, H., Rodriguez, M. H., Torres, J. A., Martinez-Palomo, A., & Tsutsumi, V. (1999). Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. *J Med Entomol* **36**, 426-34.

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., & Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-8.

Horn, S. (1987). Ectoparasites of animals and their impact on the economy of South America. In: World Veterinary Congress, *Proceedings 23 Montreal*

Hourrigan, J. L. (1977). Babesiosis bovina. Control y erradicación de la garrapata de la fiebre del ganado en los Estados Unidos de America. *Rev. Vet. Venez.* **42**: 66-76.

Hose, J. E., Martin, G. G. & Gerard, A. S. (1990). A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biol. Bull.* **178**:33-45

Ischiropoulos, H., Gow, A., Thom, S. R., Kooy, N. W., Royall, J. A., & Crow, J. P. (1999). Detection of reactive nitrogen species using 2,7- dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. *Methods Enzymol* **301**, 367-73.

Ito, T., Matsutani, T., Mori, K., & Nomura, T. (1992). Phagocytosis and hydrogen peroxide production by phagocytes of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Dev Comp Immunol* **16**, 287-94.

Iwanaga, S., Kawabata, S., & Muta, T. (1998). New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J Biochem (Tokyo)* **123**, 1-15.

Jacobsen, P. P. & Suhr-Jessen, P. (1990). The horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* has 2 kinds of hemocytes - granulocytes and plasmatocytes. *Biol. Bull.* **178**:55-64

Johns, R., Sonenshine, D. E., & Hynes, W. L. (1998). Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *J Med Entomol* **35**, 458-64.

Johnston, L. A., Kemp, D. H. & Pearson, R. D. (1986). Immunization of cattle

against *Boophilus microplus* using extracts derived from female ticks: effects of induced immunity on tick populations. *Int J Parasitol* **16**:27-34

Jones, J.C. (1977). The circulatory system of insects. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, pp.255.

Jones, O. T., & Hancock, J. T. (1994). Assays of plasma membrane NADPH oxidase. *Methods Enzymol* **233**, 222-9.

Kawabata, S., Tokunaga, F., Kugi, Y., Motoyama, S., Miura, Y., Hirata, M., & Iwanaga, S. (1996). Limulus factor D, a 43-kDa protein isolated from horseshoe crab hemocytes, is a serine protease homologue with antimicrobial activity. *FEBS Lett* **398**, 146-50.

Kawakami, N., Shimohama, S., Hayakawa, T., Sumida, Y., & Fujimoto, S. (1996). Tyrosine phosphorylation and translocation of phospholipase C-gamma 2 in polymorphonuclear leukocytes treated with pervanadate. *Biochim Biophys Acta* **1314**, 167-74.

Kawakami, N., Takemasa, H., Yamaguchi, T., Hayakawa, T., Shimohama, S., & Fujimoto, S. (1998). Indication of a protein kinase C-independent pathway for NADPH oxidase activation in human neutrophils. *Arch Biochem Biophys* **349**, 89-94.

Kettle, A. J., Carr, A. C., & Winterbourn, C. C. (1994). Assays using horseradish peroxidase and phenolic substrates require superoxide dismutase for accurate determination of hydrogen peroxide production by neutrophils. *Free Radic Biol Med* **17**, 161-4.

Khan, A. U., & Wilson, T. (1995). Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem Biol* **2**, 437-45.

Kuhn, K. H., & T. Haug. (1994). Ultrastructural, cytochemical and immunocytochemical characterization of haemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari; Chelicerata). *Cell Tissue Res* **277**: 493-504.

Klein, J. (1989). Are invertebrates capable of anticipatory immune responses? *Scand J Immunol* **29**, 499-505.

Komatsu, M., & Ando, S. (1998). A very-high-density lipoprotein with clotting ability from hemolymph of sand crayfish, *Ibacus ciliatus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 459-63.

Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H., & Beckman, J. S. (1994). Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* **16**, 149-56.

Kopacek, P., Hall, M., & Soderhall, K. (1993). Characterization of a clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur J Biochem* **213**, 591-7.

Kryuchevnikov, V. N. (1991). Protective responses of Ixodoidea hemocytes. *Mod. Acarol.* **1**: 33-334

Kylsten, P., Kimbrell, D. A., Daffre, S., Samakovlis, C., & Hultmark, D. (1992). The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands. *Mol Gen Genet* **232**, 335-43.

Ladendorff, N. E., & M. R. Kanost. 1991. Bacteria-induced protein P4 (hemolin) from *Manduca sexta*: a member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation. *Arch Insect Biochem Physiol* **18**: 285-300.

Lanz, H., Tsutsumi, V., & Arechiga, H. (1993). Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. *Dev Comp Immunol* **17**, 389-97.

Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., & Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583-93.

MacMicking, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**, 323-50.

Marmaras, V. J., Charalambidis, N. D., & Zervas, C. G. (1996). Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Arch Insect Biochem Physiol* **31**, 119-33.

Maya-Monteiro, C. M., Daffre, S., Logullo, C., Lara, F. A., Alves, E. W., Capurro, M. L., Zingali, R., Almeida, I. C., and Oliveira, P. L. (2000). HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J Biol Chem* **275**, 36584-9.

Millar, D. A. & Ratcliffe, N. A. (1994). Invertebrates. In: Turner, R. J. (ed). Immunology: A comparative Approach. *John Wiley & Sons Ltd.* pp 29-68.

Moreira-Ferro, C. K., Daffre, S., James, A. A., & Marinotti, O. (1998). A lysozyme in the salivary glands of the malaria vector *Anopheles darlingi*. *Insect Mol Biol* **7**, 257-64.

Morel, F., Doussiere, J., & Vignais, P. V. (1991). The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* **201**, 523-46.

Moreno-Manzano, V., Ishikawa, Y., Lucio-Cazana, J., and Kitamura, M. (2000). Selective involvement of superoxide anion, but not downstream compounds

hydrogen peroxide and peroxynitrite, in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of rat mesangial cells. *J Biol Chem* **275**, 12684-91.

Muller-Peddinghaus, R. (1984). In vitro determination of phagocyte activity by luminol- and lucigenin- amplified chemiluminescence. *Int J Immunopharmacol* **6**, 455-66.

Nakamura, M., Mori, K., Inooka, S., & Nomura, T. (1985). In vitro production of hydrogen peroxide by the amoebocytes of the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Dev Comp Immunol* **9**, 407-17.

Nappi, A. J., & Vass, E. (1998a). Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. *J Parasitol* **84**, 1150-7.

Nappi, A. J., & Vass, E. (1998b). Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nitric oxide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* **1380**, 55-63.

Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., & Carton, Y. (1995). Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur J Cell Biol* **68**, 450-6.

Noel, D., Bachere, E., & Mialhe, E. (1993). Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Dev Comp Immunol* **17**, 483-93.

Pick, E., & Mizel, D. (1981). Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods* **46**, 211-26.

Pipe, R. K. (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev Comp Immunol* **16**, 111-22.

Pipe, R. K., Farley, S. R., & Coles, J. A. (1997). The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res* **289**, 537-45.

Radi, R., Cosgrove, T. P., Beckman, J. S., & Freeman, B. A. (1993). Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem J* **290**, 51-7.

Rosen, G. M., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M. S., & Britigan, B. E. (1995). Free radicals and phagocytic cells. *Faseb J* **9**, 200-9.

Rosetto, M., Manetti, A. G., Giordano, P. C., Marri, L., Amons, R., Baldari, C. T., Marchini, D., & Dallai, R. (1996). Molecular characterization of ceratotoxin C, a novel antibacterial female-specific peptide of the ceratotoxin family from the medfly *Ceratitis capitata*. *Eur J Biochem* **241**, 330-7.

Salvato, B., Santamaria, M., Beltramini, M., Alzuet, G., & Casella, L. (1998). The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: o-diphenol oxidase activity. *Biochemistry* **37**, 14065-77.

Samakovlis, C., Kylsten, P., Kimbrell, D. A., Engstrom, A., & Hultmark, D. (1991). The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *Embo J* **10**, 163-9.

Samish, M., & Rehacek, J. (1999). Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu Rev Entomol* **44**, 159-82.

Samuni, A., Krishna, C. M., Cook, J., Black, C. D., & Russo, A. (1991). On radical production by PMA-stimulated neutrophils as monitored by luminol-amplified chemiluminescence. *Free Radic Biol Med* **10**, 305-13.

Schmidt, K. N., Amstad, P., Cerutti, P., & Baeuerle, P. A. (1996). Identification of hydrogen peroxide as the relevant messenger in the activation pathway of transcription factor NF-kappaB. *Adv Exp Med Biol* **387**, 63-8.

Schreck, R., Albermann, K., & Baeuerle, P. A. (1992). Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* **17**, 221-37.

Silva, P. I., Daffre, S., and Bulet, P. (2000). Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J Biol Chem* **275**, 33464-70.

Silva Jr, P. I., P. Bulet, & S. Daffre. 2000b. Antimicrobial glycine-rich doublet protein from spider *Acanthoscurria gomesiana*. *manuscrito em elaboração*.

Soderhall, K., & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* **10**, 23-8.

Sondergard, L. (1993). Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. *Trends Genet.* **9**, 193.

Sonenshine, D. E. (1991). Biology of ticks, Vol. 1, *Oxford University Press, New York*

Song, Y. L., & Y. T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev Comp Immunol* **18**: 201-9.

Spickett, A. M. (1994). Tick ecology. *Int J Parasitol* **24**, 845-9.

Sun, S. C., Lindstrom, I., Boman, H. G., Faye, I. & Schmidt, O. (1990). Hemolin: an

insect immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science* **250**,1729-1732

Szabo, C., Salzman, A. L., & Ischiropoulos, H. (1995). Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 occurs in early stages of endotoxic and hemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury. *FEBS Lett* **372**, 229-32.

Szucs, S., Vamosi, G., Poka, R., Sarvary, A., Bardos, H., Balazs, M., Kappelmayer, J., Toth, L., Szollosi, J., & Adany, R. (1998). Single-cell measurement of superoxide anion and hydrogen peroxide production by human neutrophils with digital imaging fluorescence microscopy. *Cytometry* **33**, 19-31.

Takahashi, R., Edashige, K., Sato, E. F., Inoue, M., Matsuno, T., & Utsumi, K. (1991). Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils. *Arch Biochem Biophys* **285**, 325-30.

Tokunaga, F., & Iwanaga, S. (1993). Horseshoe crab transglutaminase. *Methods Enzymol* **223**, 378-88.

Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., & *et al.* (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* **266**, 15771-81.

Weiske, J., & Wiesner, A. (1999). Stimulation of NO synthase activity in the immune-competent lepidopteran *Estigmene acraea* hemocyte line. *Nitric Oxide* **3**, 123-31.

Wharton, R. H. (1974). Ticks with especial emphasis on *Boophilus microplus*. In: Pal, R. & Wharton, R.H. Control of arthropods of medical and veterinary importance. *Plenum Press, London*.

Willadsen, P., & Jongejan, F. (1999). Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol Today* **15**, 258-62.

Wright, S. D. (1991). Multiple receptors for endotoxin. *Curr Opin Immunol* **3**, 83-90.

Wymann, M. P., von Tscharner, V., Deranleau, D. A., & Baggiolini, M. (1987). Chemiluminescence detection of H₂O₂ produced by human neutrophils during the respiratory burst. *Anal Biochem* **165**, 371-8.

Yan, L., & Adams, M. E. (1998). Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J Biol Chem* **273**, 2059-66.

Young, A. S. & Morzaria, S. P. (1986). Biology of babesia. *Parasitol. Today* **2**, 211-219

Zhioua, E., Yeh, M. T., & LeBrun, R. A. (1997). Assay for phenoloxidase activity in *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* **83**, 553-4.

Zlateva, T., Di Muro, P., Salvato, B., & Beltramini, M. (1996). The o-diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin. *FEBS Lett* **384**, 251-4