

3ª Parte

Resultados

CAPÍTULO 1

Caracterização citomorfológica e funcional dos hemócitos

As células que realizam as reacções de imunidade celular nos insectos são os hemócitos. Estes são as células alvo potenciais dos factores imunodepressores produzidos pelo complexo bacteriohelmíntico. Portanto, o estudo do modo de acção daqueles factores necessita de um bom conhecimento dos hemócitos dos insectos em perfeitas condições sanitárias. Assim, o objectivo do primeiro capítulo desta terceira parte é o de apresentar os resultados do estudo dos hemócitos normais. Após as descrições histológicas e citológicas dos hemócitos, analisámos outras características necessárias para a compreensão dos eventuais efeitos citotóxicos. Por exemplo, a evolução da imagem sanguínea *in vivo* nos insectos é necessária para compreender as perturbações desencadeadas pelo complexo nematobacteriano ou somente pela bactéria. De igual modo é indispensável o conhecimento o comportamento dos hemócitos *in vitro* em monocamadas, para poder analisar os efeitos dos factores citotóxicos purificados.

1.1. Tipos de hemócitos e funções

Em regra, é mais fácil reconhecer e identificar os diferentes tipos de hemócitos de insectos de acordo com a sua ultraestrutura do que baseado somente na morfologia que apresentam em microscopia óptica. Os hemócitos de *M. unipuncta* e de *S. littoralis* foram primeiramente observados e caracterizados em microscopia electrónica e depois foi efectuado o seu reconhecimento em microscopia fotónica sob contraste de fase. Obtiveram-se, também, imagens em microscopia electrónica de varrimento bastante sugestivas e complementares sobre o aspecto e morfologia externa destas células.

De acordo com a classificação de Brehélin e Zachary (1986) e Drif e Brehélin (1993) e as observações de Essawy *et al.*, (1985) na hemolinfa de insectos, nomeadamente, nos ortópteros e nos lepidópteros, existem quatro tipos principais de hemócitos diferentes que constituem a maior parte das células circulantes: Plasmatócitos, Granulócitos, Células Esféricas e Oenócitos. O quinto grupo de células minoritário mas comum à observação é o dos Prohemócitos. Além destes grupos de células, é de salientar que se podem observar, também, mais um ou outro tipo de células mediante a espécie de insecto que estiver em estudo. De facto, em *M. unipuncta* ocorre um sexto tipo denominado Célula Vermiforme, enquanto que, em *S. littoralis*, existem as chamadas Células de Grânulos ou Inclusões Densas. De referir que, por exemplo, em *Agrius convolvuli* (Lepidoptera: Sphingidae) e em *G. mellonella* só ocorrem os cinco primeiros tipos de células.

1.1.1. Plasmatócitos (PI)

São células que apresentam um retículo endoplásmico rugoso (RER) com cisternas bastantes alongadas e estreitas. Os ribossomas livres são abundantes, o seu citoplasma é bastante denso não possuindo inclusões granulares, o aparelho de Golgi está pouco desenvolvido e as mitocôndrias são numerosas. O núcleo está centralmente localizado e pode ser redondo, alongado e até mesmo lobado. Por vezes, apresentam pequenas extensões irregulares do plasmalema e/ou vesículas de reduzida dimensão situadas, quase sempre, à periferia da célula (Fig. 4). Raramente apresentam lisossomas primários e corpos multivesiculares, no entanto, quando se observam estas estruturas, elas nunca contêm grânulos condensados e densos aos electrões.

Os estudos citoenzimológicos mostraram que estas células não possuem actividade fenoloxidásica, que a actividade fosfatásica ácida, quando presente, é fraca podendo ser detectada no sistema vacuolar ou lisossomal e que a marcação citoquímica do glicocálice se revela, na maioria dos casos, negativa, mas quando presente este é muito fino e quase imperceptível.

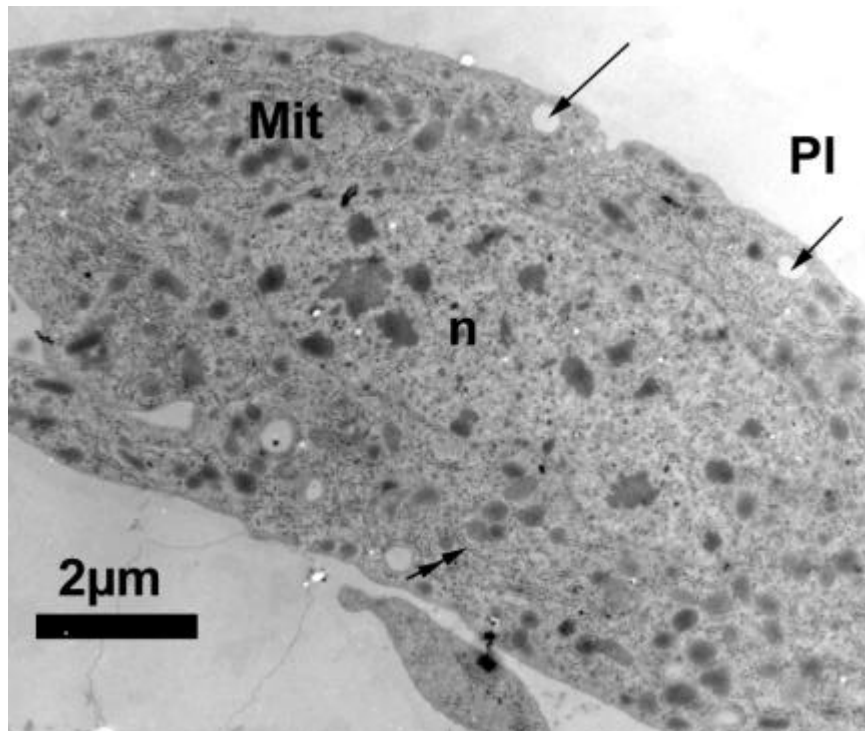


Fig. 4 - Para observação em microscopia electrónica a hemolinfa de *S. littoralis* foi recolhida directamente na solução fixadora. Aspecto de um Plasmatócito: De notar, a forma regular desta célula, sem pseudópodes ou filipodia, a ausência de inclusões no citoplasma e as cisternas do RER achatadas e longas

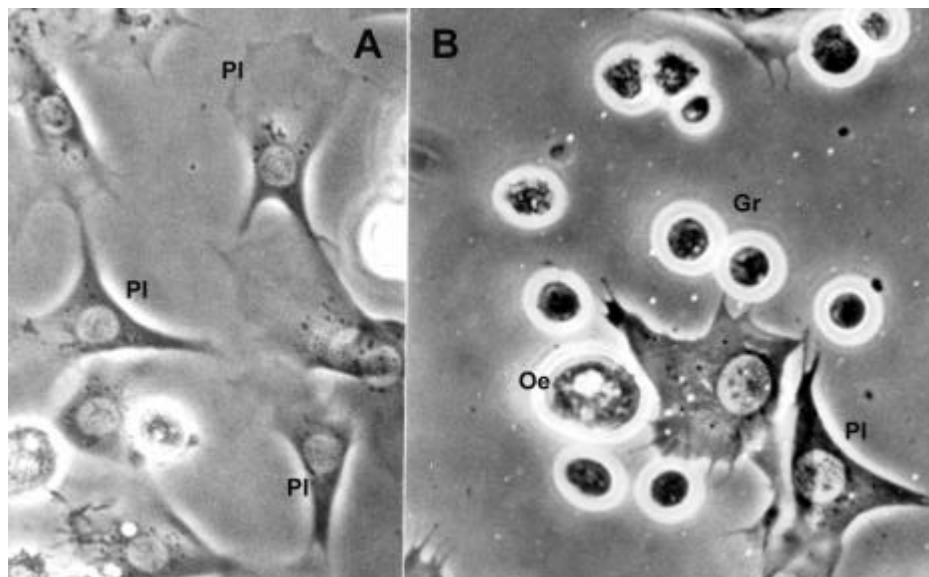


Fig. 5 - Aspecto dos Plasmatócitos de *S. littoralis* em microscopia óptica de contraste de fase. A aderência ao substrato é acompanhada de um comportamento fibroblástico com emissão de largas lamelas citoplasmáticas (lamelipodia) de onde saem longos e finos filamentos (filipodia). Os Granulócitos estão representados pelas células redondas com refringência hialina e observa-se também um Oenócito. (x400)

Em microscopia óptica, em contraste de fase, os plasmatócitos são facilmente reconhecíveis, porque são células com forma característica, sem inclusões ou vacúolos, com o citoplasma uniformemente denso, azul acinzentado e com núcleo central. *In vivo* como quando são fixados logo após a hemorragia ou quando a recolha dos hemócitos é feita directamente para dentro de tampão anticoagulante, é possível observar e constatar que a forma dos plasmatócitos é arredondada ou oval a ligeiramente fusiforme. Estas células adoptam um comportamento fibroblástico quando em contacto com um substrato ao qual aderem fortemente, designadamente, com as superfícies duras das lâminas, lamelas e placas de cultura de células. Com efeito, os plasmatócitos adquirem uma forma espreada, com emissão de largas e aderentes lamelas de citoplasma, (lamelipodia), de onde saem longos e finos filamentos, (filipodia), (Fig. 5).

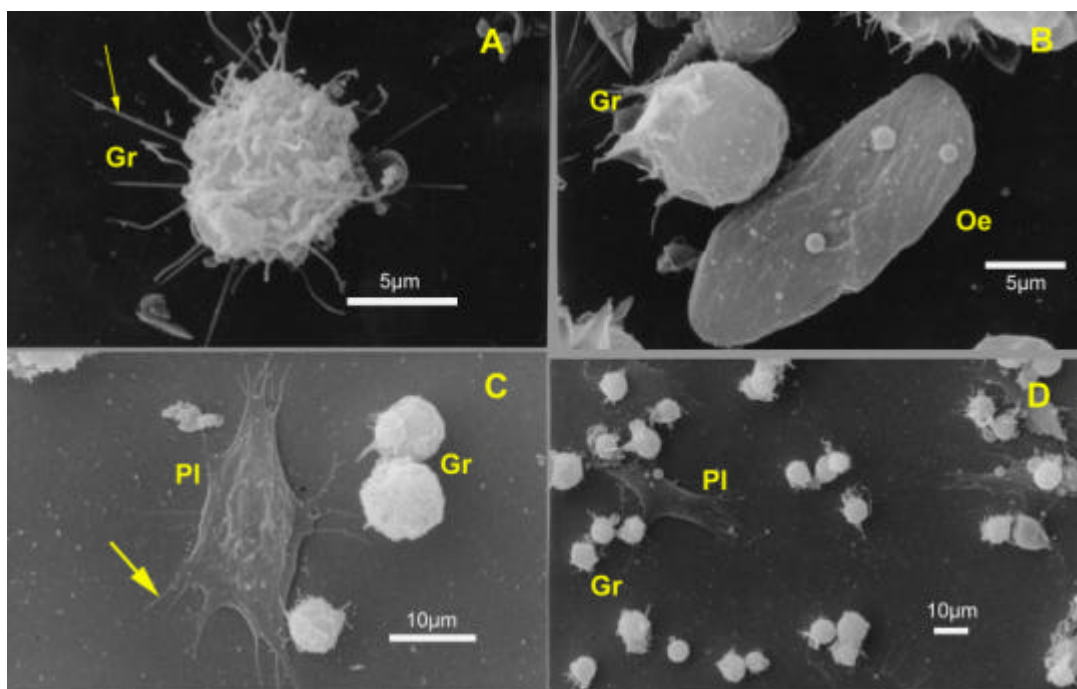


Fig. 6 – Hemócitos de *S. littoralis* em monocamadas observados em microscopia electrónica de varrimento. Em A pode observa-se o aspecto típico dos granulócitos em forma de esfera e rodeados de filamentos de citoplasma (seta) que lhe conferem a sua forma mais característica. Em B nota-se a rara presença de Oenócitos neste tipo de preparações porque são células de fraca adesividade ao substrato. Em C e D os plasmatócitos mostram a sua forma fibroblástica de adesão ao substrato com as lamelas de citoplasma bem evidenciadas (seta).

Estes aspectos são evidentes em microscopia óptica e bastante mais sugestivos em microscopia electrónica de varrimento, (Fig. 6C). São as células responsáveis pelo encapsulamento tanto *in vitro* como *in vivo*, mas mostram nulas ou muito reduzidas capacidades para efectuar a fagocitose.

In vitro nas monocamadas de hemócitos são células que se mantêm estáveis e viáveis por longos períodos de tempo, por exemplo, quando incubadas somente com PBS, os plasmatócitos permanecem com a sua ultraestrutura inalterável durante, pelo menos, duas horas.

1.1.2. Hemócitos granulares ou granulócitos (HGI)

São os hemócitos, de acordo com o descrito por Essawy *et al.*, (1985) e Brehélin e Zachary, (1986), denominados granulócitos do tipo I. Estas células apresentam uma ultraestrutura em que é possível observar no seu citoplasma três tipos de inclusões delimitadas por membrana: i) inclusões heterogéneas de natureza reabsorptiva com densidade electrónica variável, ii) inclusões uniformemente densas e iii) inclusões com estrutura microtubular. Uma das características marcantes destas células é, também, a ocorrência de numerosos vacúolos, em geral, vazios e de dimensões razoáveis, que se encontram nas vizinhanças do plasmalema. À periferia das células observam-se longos e recurvados filamentos de citoplasma, os denominados filipodia, e numerosas vesículas de pinocitose. O retículo endoplásmico rugoso está muito desenvolvido e as suas cisternas são largas e repletas de material flocolento. O aparelho de Golgi é numeroso e mostra actividade da fosfatásica ácida no lúmen das suas cisternas enquanto que a da fenoxidase está ausente. O glicocálice dos granulócitos está quase sempre presente mostrando-se moderadamente desenvolvido. Na hemolinfa das lagartas dos últimos dias do sexto estado e nas pré-crisálidas de *M. unipuncta* é comum observar-se um aumento significativo das inclusões heterogéneas de natureza reabsorptiva. Estes corpos tornam-se numerosos com dimensões apreciáveis modificando o aspecto ultrastrutural destas células tornando possível a sua confusão com células esféricas. No

entanto, em *G. mellonella* e *S. littoralis* este fenómeno parece não ocorrer ou, então, é muito menos evidente.

Em microscopia óptica, com contraste de fase, os granulócitos mostram ser células arredondadas de forma globular, responsável pelo aparecimento de uma coroa luminosa, hialina e refringente que lhes delimita o contorno, com vários filamentos a envolvê-las, com numerosas inclusões citoplasmáticas, assim como, vacúolos de diversas dimensões. São células que apresentam uma aderência moderada ao substrato e *in vitro* mostram uma desgranulação bastante evidente (Fig. 7A). Com o avançar do tempo de incubação as suas inclusões tornam-se cada vez menos numerosas e os vacúolos cada vez mais evidentes. Em microscopia electrónica de transmissão é relativamente fácil observar a desgranulação das inclusões com estrutura fibrilar, notando-se a saída do material natureza flocolenta permanecendo a envolver exteriormente as células. Apesar da desgranulação que sofrem, aquando mantidos em monocamadas, estas células mantêm-se viáveis por muito tempo. Nos insectos observados e estudados no presente trabalho são as células responsáveis pela fagocitose, (Fig. 7), assemelhando-se aos macrófagos dos vertebrados pela especificidade com que efectuam esta função. A microscopia electrónica de varrimento fornece imagens sugestivas sobre o aspecto dos granulócitos e o seu comportamento quando em contacto com o substrato. De notar, os numerosos filamentos que adornam a superfície da membrana celular e que lhes conferem o aspecto morfológico externo tão característico, (Fig. 6A). Pela análise destas fotomicrografias, constata-se que os granulócitos estão firmemente aderentes ao substrato, por intermédio dos filamentos, mas que não adquirem as formas fibroblásticas achatadas dos plasmatócitos. Com efeito, estas células mantêm a sua forma globular esférica, envolvida em numerosos filamentos citoplasmáticos, que explicam a refringência hialina com que estão rodeadas quando observados em microscopia fotónica.

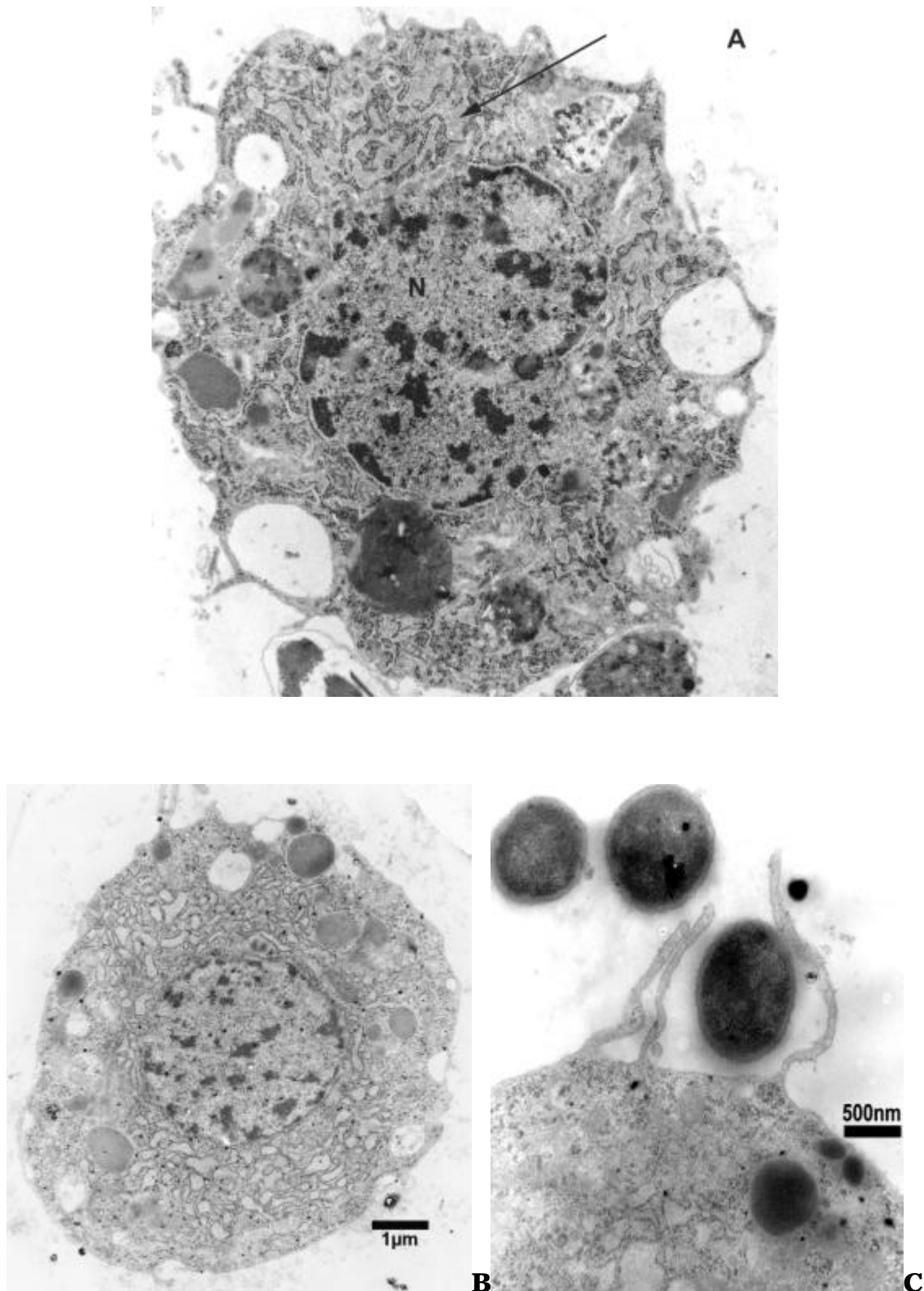


Fig. 7 – Granulócitos de *S. littoralis*: De notar, as cisternas do RER dilatadas (seta em A) e a presença de filipodia (C) a efectuar a fagocitose. Em B observam-se os perfis do retículo bastante dilatados e repletos de material flocculento.

1.1.3. Células esféricas (Cesf)

Estes hemócitos em forma de disco de dimensão variável, consoante as espécies estudadas, devem a sua ultraestrutura às numerosas e proeminentes inclusões esféricas intracitoplasmáticas que possuem. Em algumas células, o citoplasma está tão repleto e ocupado pelas inclusões que o seu diminuto volume está confinado, em geral, ao centro da célula e o núcleo aparece com a forma arredondada e/ou lobada e bastante distorcida, (Fig. 8A).

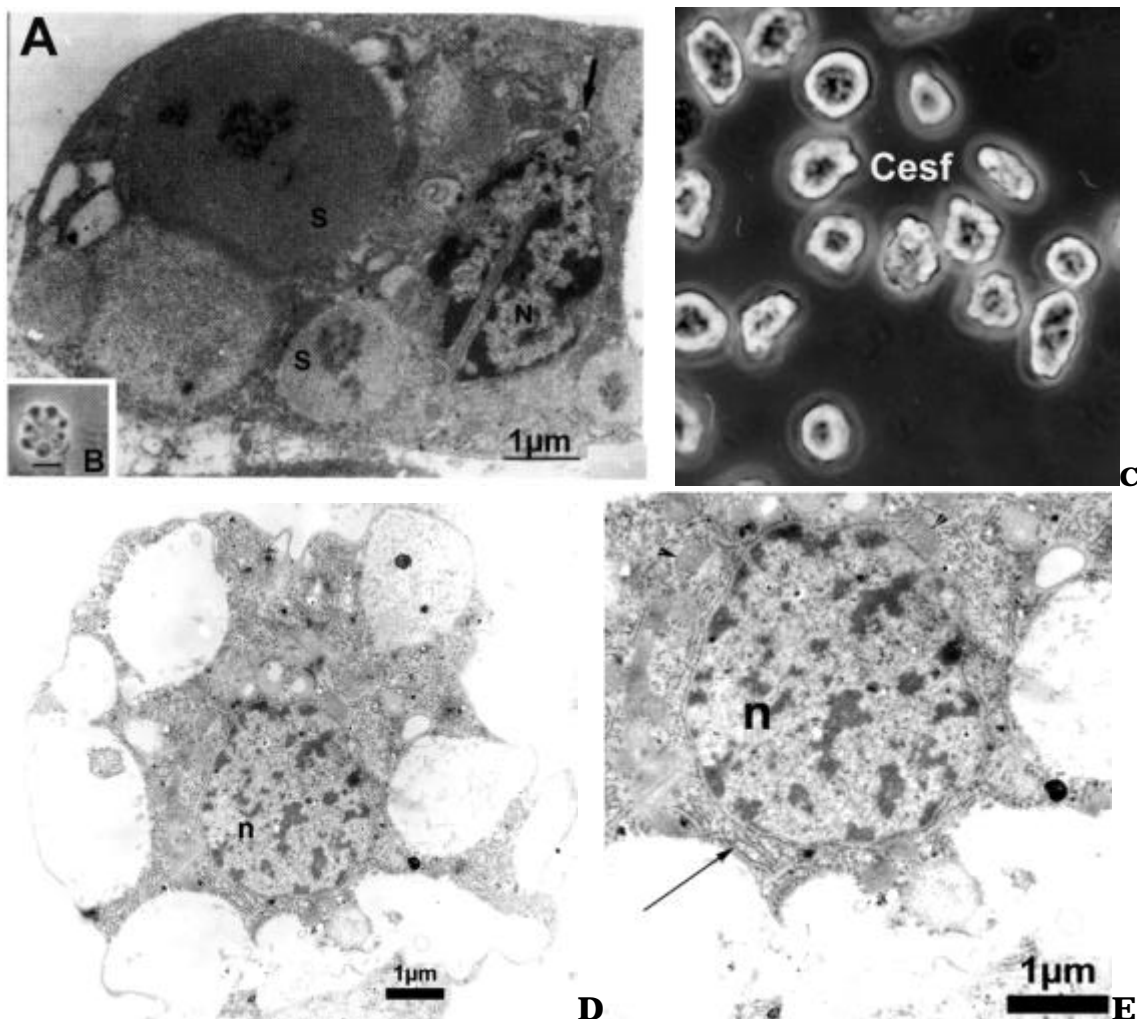


Fig. 8 - Células esféricas de *M. unipuncta* (A e B) e *S. littoralis* (C, D e E). A célula em D e E está a perder o conteúdo das suas inclusões. De notar, (seta em E) o RER com cisternas bem desenvolvidas e com material flocoento no seu interior.

Em regra, o citoplasma apresenta alguns dictiossomas do aparelho de Golgi e um RER bem desenvolvido com largas cisternas. As inclusões estão

encerradas no interior de vesículas com membrana de origem golgiana, (Brehélin e Zachary, 1986). As inclusões típicas destas células são regulares de forma esférica e, em microscopia electrónica de transmissão, as secções mostram uma ultraestrutura do conteúdo interno das inclusões cujo aspecto pode apresentar-se i) finamente granular ou flocolento, como é o caso de *G. mellonella* e *M. unipuncta* ou ii) com uma estrutura regular, semelhante a um arranjo cristalino ou, dependendo da incidência do corte, com o aspecto de membranas enroladas concentricamente e/ou em espiral, como em *S. littoralis*. Nas lagartas de *M. unipuncta*, do sexto e sétimo dia do ultimo estado, estas células aparecem com enormes espaços vazios, semelhantes a vacúolos. Esta observação é mais evidente em *G. mellonella* na qual é possível constatar a desgranulação das células esféricas em grande quantidade.

As células esféricas não possuem actividades fenoloxidásica ou fosfatásica ácida. O glicocálice não está presente ou é pouco desenvolvido e a citoquímica das esférulas em *M. unipuncta* revelou a presença de um nódulo central proteico, (Ribeiro, 1994). Estas células são facilmente reconhecíveis em microscopia óptica, (Fig. 8B) não apresentando capacidade de aderência ao substrato ou sendo esta muito fraca. São, por isso, facilmente descartáveis das superfícies onde se estabelecem as monocamadas de hemócitos. No entanto, apresentam-se muito estáveis nas incubações *in vitro* e raramente mostram alterações da sua forma ou aspecto.

1.1.4. Oenócitos (Oe)

Estes hemócitos possuem, em regra, grandes dimensões com formas muito variáveis desde ovais, alongadas ou arredondadas. O núcleo posiciona-se excentricamente e o citoplasma com numerosos ribossomas é muito pobre em organitos e compartimentos. Em *M. unipuncta* e *G. mellonella* o citoplasma apresenta áreas de densidade electrónica variável, finamente granular, (Fig. 9A) enquanto que em *S. littoralis* se apresenta com o aspecto de uma rede fibrilar longitudinal, (Fig. 9C). Os oenócitos possuem actividade fenoloxidásica que não está confinada a um determinado organito mas que se encontra difundida por

todo o citoplasma. Têm uma fraca adesividade ao substrato e a sua estabilidade, quando presentes nas monocamadas de hemócitos incubadas em PBS, é bastante variável consoante a espécie de insecto em causa.

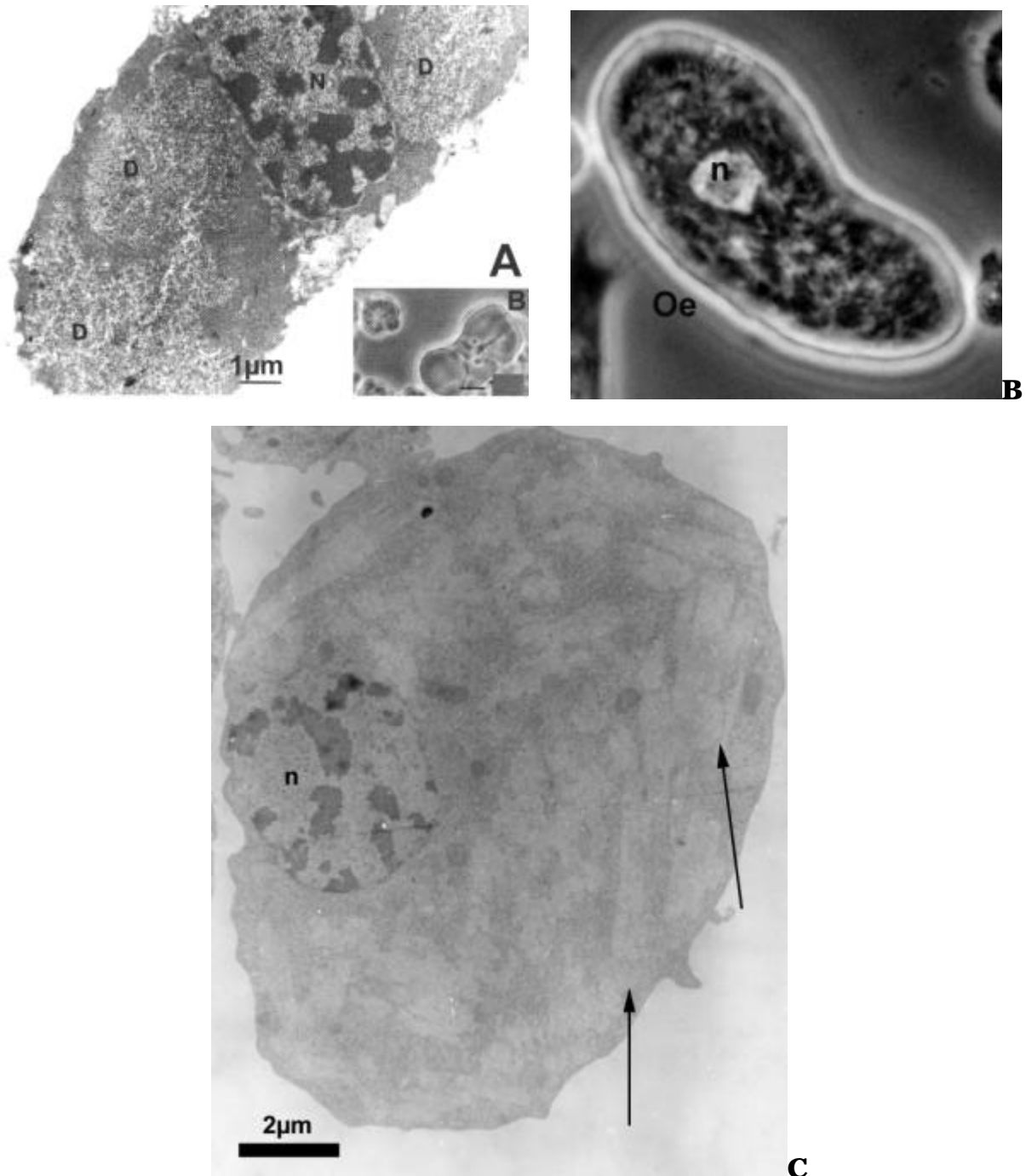


Fig. 9 – Oenócitos de *M. unipuncta* (A) e de *S. littoralis* (B e C). De notar, a natureza granulosa e de menor densidade electrónica (D) dos conteúdos na célula em A e fibrilar na célula em C. (n=núcleo).

1.1.5. Prohemócitos (PrH)

Estas células têm uma forma redonda bastante regular, sem pseudópodes. A ultraestrutura mostra os organitos celulares moderadamente presentes e desenvolvidos com exceção dos ribossomas que são numerosos. Não possuem reactividade à detecção das actividades da fenoloxidase e da fosfatase ácida e o citoplasma não tem inclusões nem vesículas. Além disto, são as células que apresentam uma relação núcleo/citoplasma muito elevada. Em microscopia óptica em contraste de fase são células com uma refringência dourado acastanhada muito característica, de pequena dimensão, apresentando uma aderência moderada ao substrato, sendo capazes de emitir filamentos para a sua fixação. Apesar de raros e minoritários, no cômputo geral dos hemócitos, quando presentes, mostram estabilidade e viabilidade quando em monocamadas incubadas em PBS.

1.1.6. Células vermiformes (Cvm)

Em *M. unipuncta* a sua existência é vestigial mas são hemócitos muito característicos no que concerne à forma e ultraestrutura. Com efeito, são células muito alongadas e finas, com um núcleo bastante sinuoso, longo e lobado e com numerosas inclusões citoplasmáticas arredondadas. Estas inclusões parecem estar envolvidas por membrana. Em microscopia óptica podem ser confundidos com os plasmatócitos mas, a sua adesão ao substrato é fraca, não alterando a morfologia externa devido à emissão de pseudópodes e filamentos de citoplasma quando incubados em monocamada, (Fig. 10).

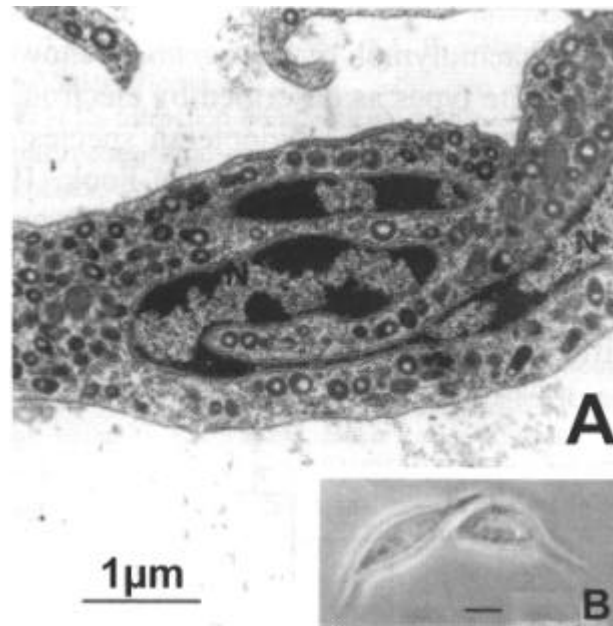


Fig. 10 – Célula Vermiforme de *M. unipuncta*. De notar o seu núcleo em forma de ferradura e as numerosas e densas inclusões no citoplasma. Em B um pormenor destas células em microscopia óptica com contraste de fase.

1.1.7. Células de grânulos/inclusões densas (Cgd)

Em *S. littoralis* constituem um grupo de células hemocitárias cuja forma e ultraestrutura são muito características. De facto, estas células apresentam uma forma discóide, em disco biconvexo achatado com os bordos muito finos, com um eixo longitudinal muito mais longo do que o transversal o qual apresenta a sua máxima largura na porção central da célula. O citoplasma destas células é bastante denso, repleto de ribossomas livres e com numerosos perfis das cisternas do RER, alargadas e repletas de material fino. As mitocôndrias são numerosas e proeminentes e o núcleo apresenta-se denso com a cromatina bem estruturada. A membrana celular é levemente sinuosa, com emissão de pequenas extensões de citoplasma e com reentrâncias que poderão corresponder a vesículas de pinocitose. Na periferia da célula encontram-se, também, pequenos lisossomas ou vacúolos transparentes. No entanto, a característica mais marcante é a profusa existência de grânulos ou inclusões esféricas, uniformemente densas aos electrões, de contornos mais ou menos sinuosos e que parecem estar encerradas no interior de vesículas. Estas inclusões devem ter sensivelmente a mesma dimensão, no entanto, as secções ultrafinas mostram grânulos de diferente

diâmetro, dada a incidência do corte, em regiões mais ou menos afastados do plano médio dos grânulos esféricos, (Fig. 11 A e C).

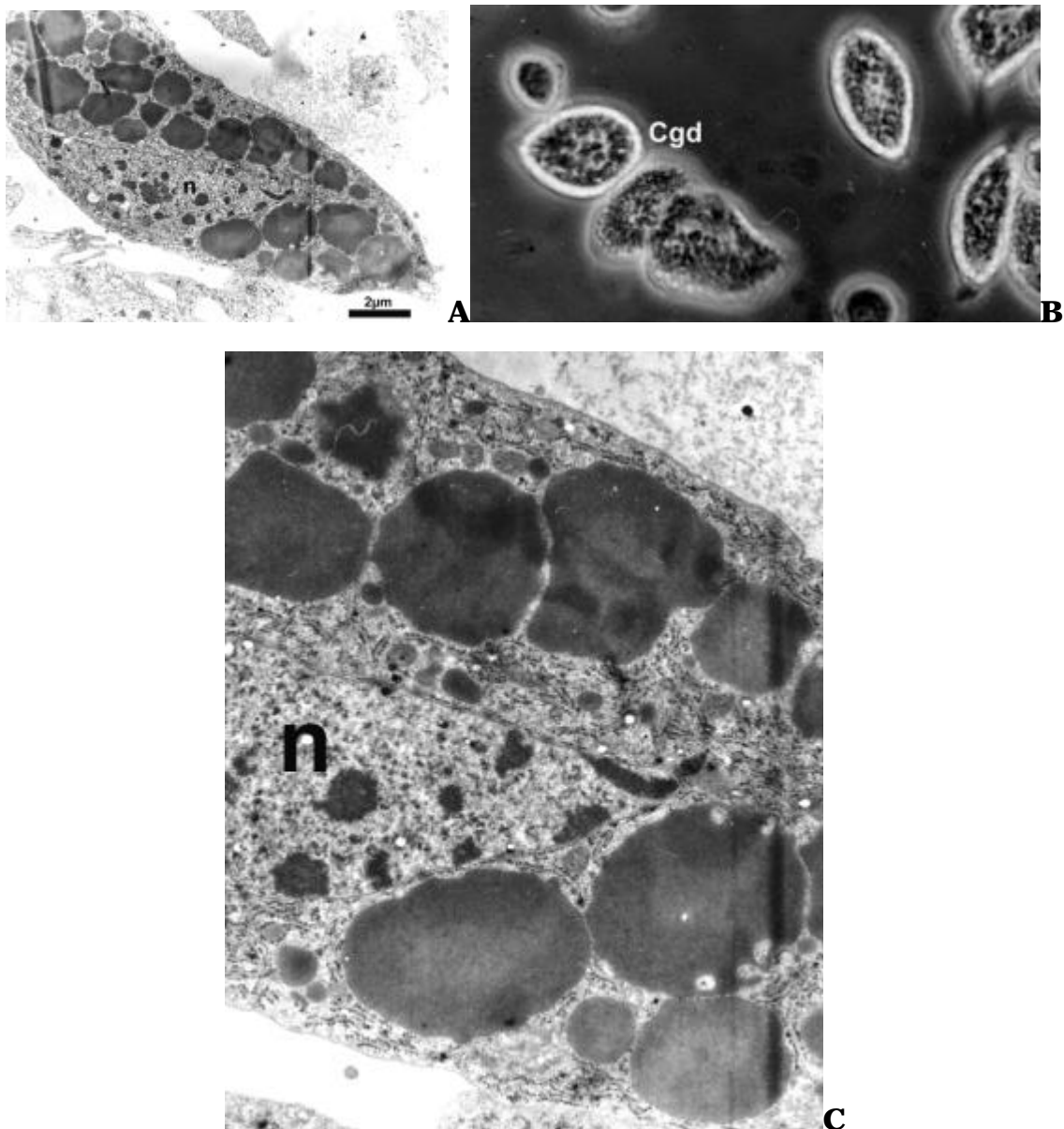


Fig. 11 – Células de grânulos ou inclusões densas de *S. littoralis*: O citoplasma destas células está repleto de ribossomas livres e com numerosos perfis das cisternas do RER, alargadas e repletas de material fino. As mitocôndrias são numerosas e proeminentes e o núcleo apresenta-se denso com a cromatina bem estruturada. De notar as numerosas inclusões densas que preenchem uma grande parte do volume celular.

Em microscopia óptica estas células emanam uma refringência hialina, que as preenche completamente, no interior das quais se observaram as inclusões (Fig. 11B). Têm uma dimensão superior aos granulócitos e possuem uma fraca adesão ao substrato, no entanto, quando presentes nas monocamadas

de hemócitos, mesmo quando incubadas em PBS, são bastante estáveis não mostrando alterações da sua estrutura e morfologia.

1.2. Viabilidade dos hemócitos em monocamadas

Os métodos de recolha de hemócitos e sua subsequente manipulação em monocamadas para ensaios *in vitro*, mostrou ser uma técnica eficaz que preserva as características morfológicas, a estabilidade e a viabilidade celular com níveis muito baixos de mortalidade. Com efeito, as monocamadas extemporâneas de hemócitos, incubados em PBS sobre lâmina, lamela ou nos poços de caixas de cultura celular, mostram uma viabilidade média de 98-99% na primeira hora e de 95-96% à terceira hora de incubação. No entanto, quando se estabelecem as culturas primárias de hemócitos, nas quais as células estão banhadas pelo meio G3, a viabilidade é muito maior e as células podem ser mantidas por períodos superiores a 120 h com uma mortalidade média situada entre 2%-5%. Nestas condições observa-se uma muito boa estabilidade celular geral, os plasmatócitos a mostrarem figuras fibroblásticas estáveis, sem vacuolização ou alteração do seu citoplasma e, por seu lado, os granulócitos com fracos níveis de desgranulação ao longo do tempo. Quando propositadamente não descartadas, pelos processos de lavagem das monocamadas de hemócitos, as células esféricas mantêm-se inalteráveis durante todo o tempo de incubação, contudo, os oenócitos mostram a instabilidade que os caracteriza tanto em *M. unipuncta* como em *S. littoralis* denunciando o quanto são frágeis durante a manipulação *in vitro*. De notar, contudo que os oenócitos são acessíveis à observação, tanto em PBS como em meio G3, por períodos suficientemente longos para que possa ser avaliado a sua viabilidade, comportamento e estabilidade. Regra geral, os oenócitos, são células instáveis mantendo-se presentes *in vitro* somente durante algum tempo Curioso é o facto de que, por exemplo, em *G. mellonella* os oenócitos são células que se apresentam estáveis e viáveis até, pelo menos, 1 h de incubação em PBS, enquanto que em *M. unipuncta* e *S. littoralis* se alteram rapidamente, só sendo possível, neste último caso, a sua observação nos primeiros minutos da

incubação. Em *A. convolvuli*, porém, o seu número é elevado mantêm-se inalteráveis por longos períodos de tempo que ascendem a 12 h.

1.3. Evolução da imagem sanguínea

Os resultados diários do cálculo do peso, do volume de hemolinfa e da contagem total e diferencial de hemócitos permitiram estabelecer o padrão médio da evolução normal da imagem sanguínea em *M. unipuncta* e *S. littoralis* que os Gráficos I-VI, respectivamente, representam. De notar, que o critério peso é bastante estável na variação média apresentando valores significativos sem grandes desvios padrão ao longo do tempo de desenvolvimento larvar durante o estado considerado. Por seu lado, o critério volume já apresenta uma variação com grandes desvios padrão que faz com que as médias não sejam tão clara e significativamente diferentes ao longo do tempo de duração do estado larvar em ambos os insectos considerados.

A variação do volume de hemolinfa parece estar correlacionado com o aumento do peso das lagartas (Gráficos I e II). De facto, o volume da hemolinfa aumenta na razão directa do peso das lagartas, podendo assumir-se que aquele primeiro participa significativamente variação do segundo a par com o consumo alimentar. Com efeito, quando se observa o comportamento das lagartas, pode-se constatar que estas apresentam uma actividade trófica assinalável, durante os três primeiros dias após a chegada ao sexto estado larvar, período durante o qual a actividade alimentar é bastante importante e onde os insectos adquirem o essencial do seu desenvolvimento com ganho de peso e aumento de dimensão. O consumo de alimento parece diminuir a partir do quarto ou quinto dia e este facto poderá estar correlacionado com a diminuição do peso e do volume da hemolinfa. Por seu lado, a análise combinada dos gráficos relativos à contagem total de hemócitos (Gráficos III e IV) com os do volume de hemolinfa/peso das lagartas (Gráficos I e II) mostra que o número total de hemócitos acompanha as anteriores variações e que, no período de franco crescimento dos insectos, se assiste a uma hematopoése muito significativa, nos três primeiros dias, com o número total de hemócitos a ter um importante incremento.

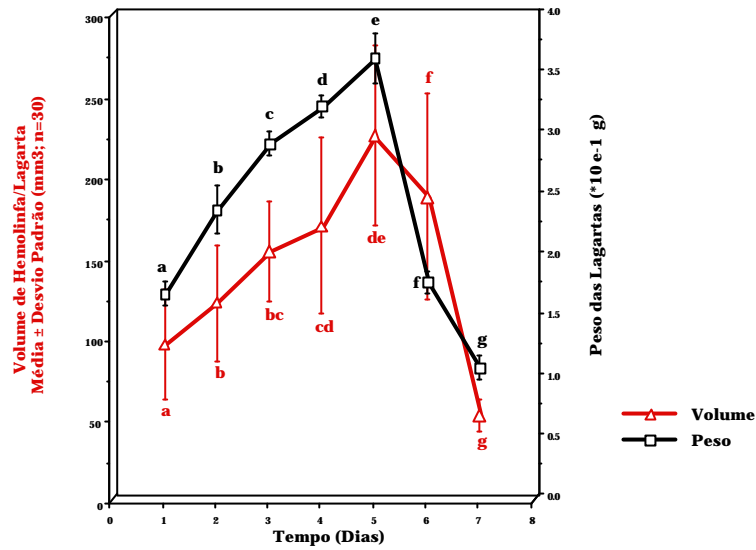


Gráfico I – Média da variação do Volume de Hemolinfa/Lagarta e do Peso/Lagarta ao longo dos sete dias de duração do sexto e último estado larvar de *Mythimna unipuncta*. Os valores do volume de hemolinfa e peso das lagartas com letras iguais não são significativamente diferentes, (Teste Duncan de análise de médias multicomparadas; $\alpha=0,05$).

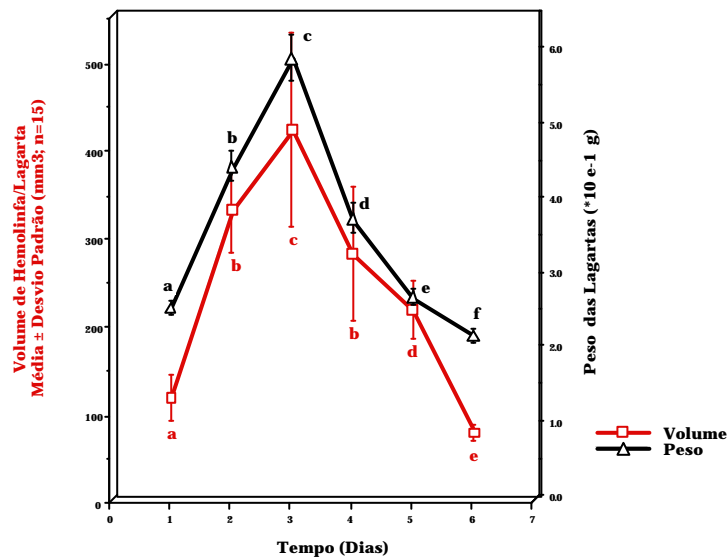


Gráfico II – Média da variação do Volume de Hemolinfa/Lagarta e do Peso/Lagarta ao longo dos seis dias de duração do sexto e último estado larvar de *Spodoptera littoralis*. Os valores do volume de hemolinfa e peso das lagartas com letras iguais não são significativamente diferentes, (Teste Duncan de análise de médias multicomparadas; $\alpha=0,05$).

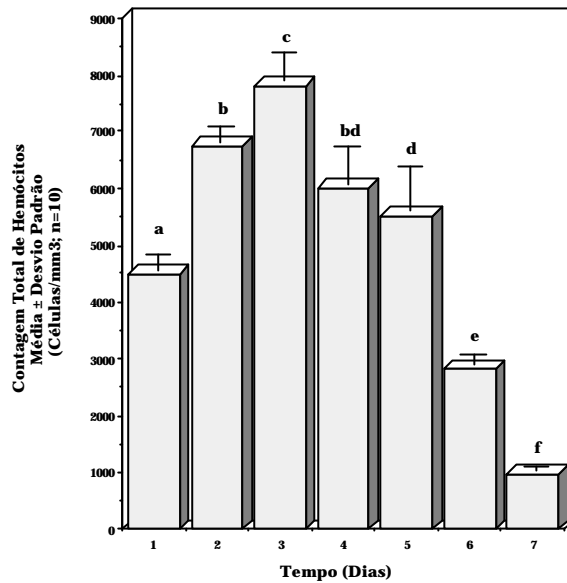


Gráfico III – Variação da Contagem Total de Hemócitos (CTH) de *Mythimna unipuncta* durante os sete dias de duração do sexto e último estado larvar. Os valores, expressos em média do número total de células±desvio padrão, estão corrigidos em relação ao peso das lagartas. Os valores com letras iguais não são significativamente diferentes, (Teste Duncan de médias multicomparadas; $\alpha=0,05$).

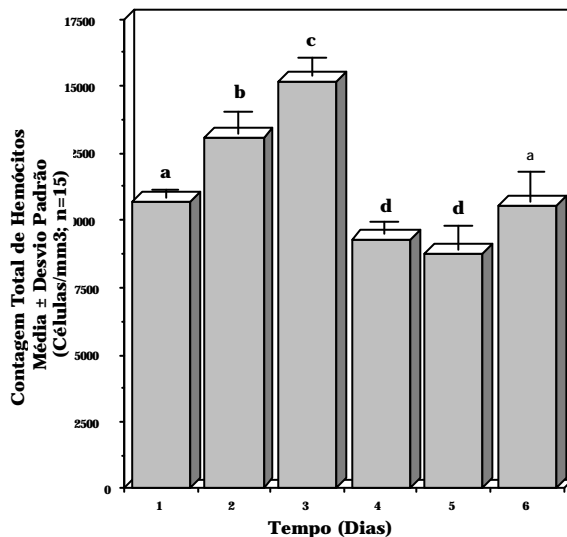


Gráfico IV – Variação da Contagem Total de Hemócitos (CTH) de *Spodoptera littoralis* durante os seis dias de duração do sexto e último estado larvar. Os valores, expressos em média do número total de células±desvio padrão, estão corrigidos em relação ao peso das lagartas. Os valores com letras iguais não são significativamente diferentes, (Teste Duncan de médias multicomparadas; $\alpha=0,05$).

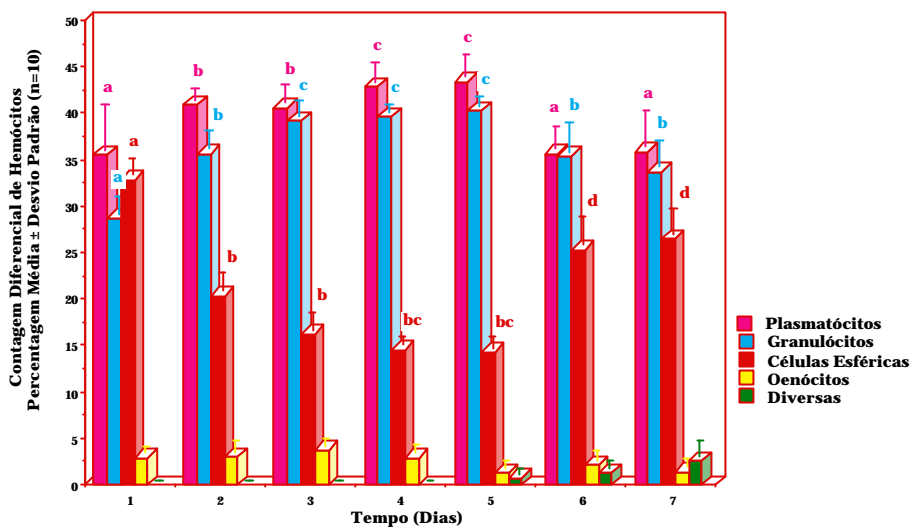


Gráfico V – Variação da Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH) de *Mythimna unipuncta* durante os sete dias de duração do sexto e último estado larvar. Os valores estão expressos em percentagem média do número diferencial de células \pm desvio padrão. Os valores com letras iguais não são significativamente diferentes, (Teste Duncan de médias multicomparadas; $\alpha=0,05$).

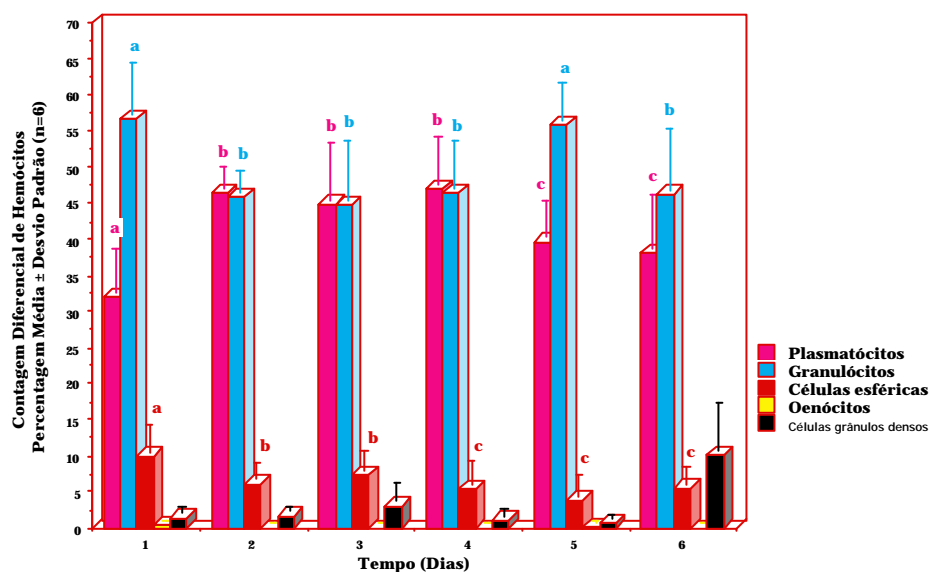


Gráfico VI – Variação da Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH) de *Spodoptera littoralis* durante os seis dias de duração do sexto e último estado larvar. Os valores estão expressos em percentagem média do número diferencial de células \pm desvio padrão. Os valores com letras iguais não são significativamente diferentes, (Teste Duncan de médias multicomparadas; $\alpha=0,05$).

Por seu turno, a contagem diferencial de hemócitos (Gráficos V e VI) revela que os hemócitos majoritariamente presentes na hemolinfa dos insetos no sexto

estado larvar são os plasmatócitos e os granulócitos. Em conjunto, estes dois tipos de células perfazem cerca de 85-95% do total de células circulantes na hemolinfa de *S. littoralis* e enquanto que em *M. unipuncta* estes valores rondam 65-85%. Na hemolinfa das lagartas desta última espécie é notório que as células esféricas apresentam uma percentagem bastante significativa durante o primeiro dia a qual decresce entre o segundo e o quinto dia voltando a aumentar nos dois últimos dias. No primeiro e sétimo dia a percentagem de células esféricas ronda 33% e 27% respectivamente. A percentagem deste tipo de hemócitos é modesta em *S. littoralis* quando comparada com a de *M. unipuncta* porque as células esféricas não contam mais do que 10% do total de hemócitos e este valor observa-se somente no primeiro dia do sexto estado. De realçar, porém, a presença, cada vez mais numerosa, de células com grânulos densos em *S. littoralis* que estão modestamente representadas durante os cinco primeiros dias do estado mas que, no sexto dia, vêm a sua percentagem diferencial ascender a 10% do total de células. É possível postular a hipótese de que em *S. littoralis* estas células possuam uma papel fisiológico particular dependente do estado de desenvolvimento do insecto, contudo, essa função é, de momento, completamente desconhecida. Finalmente, os oenócitos contribuem com percentagens muito diminutas para o cômputo global de hemócitos, contudo, a sua presença é mais facilmente assinalada em *M. unipuncta* do que em *S. littoralis* facto ao qual não deve ser estranha a estabilidade destas células quando manipuladas *in vitro*.

1.4. Detecção de receptores Lectina e LPS no plasmalema dos hemócitos

Os resultados dos ensaios de detecção de receptores lectina e LPS no plasmalema dos hemócitos estão apresentados nas Tabelas I a V.

Da análise destas tabelas ressalta o facto de que, tanto em *M. unipuncta* com em *S. littoralis*, são apenas os granulócitos, os hemócitos iluminados em presença de lectinas-FITC sendo a de *Arachis hypogea* a que apresenta o maior número de receptores (Fig. 12), não podendo deixar, também, de se assinalar a

existência moderada de receptores lectina de *Lens culinaris* nestas células, (Tabelas I e II).

De realçar um resultado muito interessante que se prende com a endocitose mediada por receptores que se observa nos granulócitos. Com efeito, passados 30 min de incubação, tanto com Lectinas-FITC como LPS-FITC, é possível constatar que a intensidade da marcação diminui no plasmalema e que este se transfere sequencialmente para o interior de vesículas de endocitose. Uma vez aqui a fluorescência acaba por se atenuar gradualmente até desaparecer fruto da digestão ao nível do sistema endomembranar (Fig. 12 D).

Quanto à detecção de receptores LPS de *E. coli* os resultados demonstraram que, em todos os casos, a reactividade dos plasmatócitos é muito fraca não tendo sido possível a sua detecção em mais nenhum outro tipo de células (Tabelas III e IV).

De assinalar que a detecção de receptores lectina *in vivo* forneceu resultados semelhantes aos obtidos *in vitro*. De facto, a população hemocitária que se encontrava marcada eram os granulócitos, em particular, com as lectinas de *A. hypogea* e *L. culinaris*. Quanto aos LPS não se observou nenhuma marcação hemocitária.

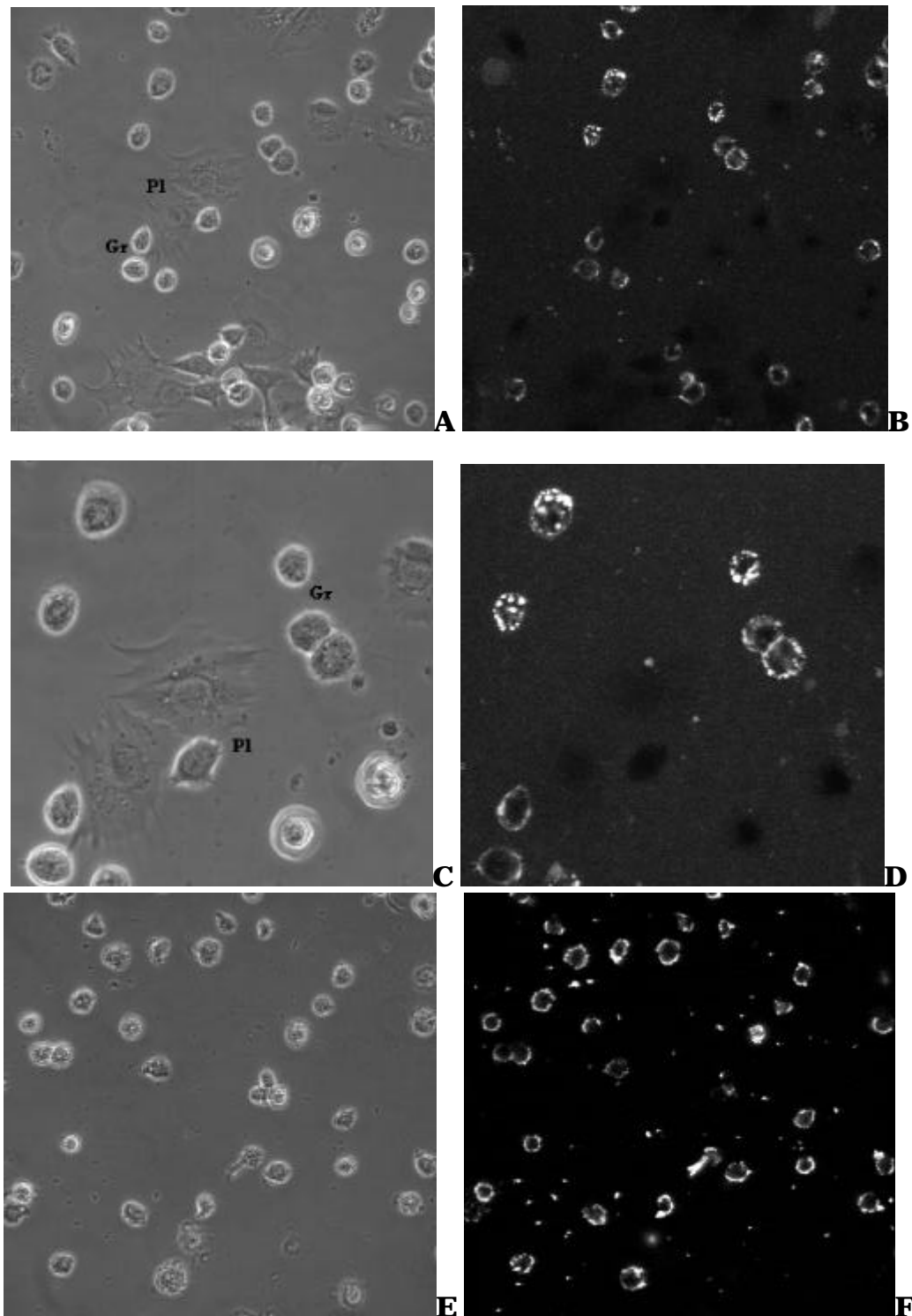


Fig. 12 a-f – Marcação de hemócitos com a lectina-FITC de *Arachis hypogea*. a-d) hemócitos de *S. littoralis*; e-f) hemócitos de *M. unipuncta*. Nas duas últimas fotografias só existem granulócitos. De notar que são os granulócitos as células que se iluminam em presença desta lectina-FITC, (Microscopia confocal x400). Em C e D (pormenor de A e B) é evidente a diferença de marcação entre plasmatócitos (Pl) e granulócitos (Gr). De notar, que os Lectinas-FITC são incorporadas nas células por intermédio de vesículas de endocitose. Com efeito, quando a incubação dura mais de 30 min, é possível constatar que a fluorescência passa da membrana celular para o interior das vesículas de endocitose até que desaparece na digestão ao nível do sistema endossomal.

1.5. Caracterização e viabilidade das células da linhagem *Slb2*

As células da linhagem *Slb2* estão, ainda, em fase de caracterização funcional e estrutural. No entanto, a linhagem é oriunda de hemócitos de *S. littoralis* e as células assemelham-se bastante a granulócitos possuindo, inclusivamente, capacidades fagocíticas, (Girard e Brehélin, comunicação pessoal). Nas condições em se efectuam as manipulações as células são confluentes após uma semana e apresentam o mais elevado grau de viabilidade. De facto, a viabilidade é total nunca se tendo observado qualquer percentagem de mortalidade dentro do seu período de utilização.

Quando se analisam os resultados em presença de células da linhagem *Slb2* estes são semelhantes aos referidos para os hemócitos mas ligeiramente mais fracos no que concerne aos receptores lectina, (Tabela V).

Tabela I

Receptores membranares Lectina-FITC nos hemócitos de *M. unipuncta*

Tipo de Hemócitos	Lectinas-FITC					
	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Helix aspersa</i>	<i>Arachis hypogea</i>	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	<i>Lens cullinaris</i>	<i>Triticum vulgare</i>
Granulócitos	+	+	+++++	+	+++	+
Plasmatócitos	-	-	-	-	-	-
Células esféricas	-	-	-	-	-	-
Oenócitos	-	-	-	-	-	-

(-) Negativo; (+) Fraco, (++) Moderado, (+++) Médio, (+++++) Forte, (+++++) Muito Forte

Tabela IIReceptores membranares Lectina-FITC nos hemócitos de *S. littoralis*

Tipo de Hemócitos	Lectinas-FITC					
	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Helix aspersa</i>	<i>Arachis hypogea</i>	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	<i>Lens cullinaris</i>	<i>Triticum vulgaris</i>
Granulócitos	+	+	+++++	+	+++	+
Plasmatócitos	-	-	-	-	-	-
Células esféricas	-	-	-	-	-	-
C. Grânulos Densos	-	-	-	+	-	++
Pró Hemócitos	-	-	-	-	-	-
Oenócitos	-	-	-	-	-	-

(-) Negativo; (+) Fraco, (++) Moderado, (+++) Médio, (+++++) Forte, (+++++) Muito Forte

Tabela IIIReceptores membranares LPS-FITC de *E. coli* nos hemócitos de *M. unipuncta*

Tipo de hemócitos	LPS-FITC <i>Escherichia coli</i> ¹
Granulócitos	-
Plasmatócitos	+
Células esféricas	-
Oenócitos	-

(-) Negativo; (+) Fraco, (++) Moderado, (+++) Médio, (+++++) Forte, (+++++) Muito Forte

¹ Sigma F-3665 e F-8666 Serotipos 055:B4 e 0111:B4**Tabela IV**Receptores membranares LPS-FITC de *E. coli* nos hemócitos de *S. littoralis*

Tipo de hemócitos	LPS-FITC <i>Escherichia coli</i> ¹
Granulócitos	-
Plasmatócitos	+
Células esféricas	-
C. grânulos densos	-
Prohemócitos	-
Oenócitos	-

(-) Negativo; (+) Fraco, (++) Moderado, (+++) Médio, (+++++) Forte, (+++++) Muito Forte

¹ Sigma F-3665 e F-8666 Serotipos 055:B4 e 0111:B4

Tabela VReceptores membranares Lectina-FITC e LPS-FITC nas células *SI2b*

Lectinas-FITC	Células <i>SI2b</i>
<i>Canavalia ensiformis</i>	+
<i>Helix aspersa</i>	+
<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	+
<i>Lens culinaris</i>	++
<i>Arachis hypogea</i>	++++
<i>Triticum vulgare</i>	-
LPS-FITC	
<i>Escherichia coli</i> ¹	-

(-) Negativo; (+) Fraco, (++) Moderado, (+++) Médio, (++++) Forte, (+++++) Muito Forte

¹ Sigma F-3665 e F-8666 Serotipos 055:B4 e 0111:B4

1.6. Conclusão

Dispomos agora de metodologias que nos permitem obter células que podemos manipular *in vitro* e sobre as quais vão poder ser testados os eventuais factores tóxicos produzidos pelo complexo bacteriohelmíntico. As células são os hemócitos ou as células pertencentes a uma linhagem celular imortalizada (*SI2b*).

* A partir dos hemócitos recolhidos das lagartas podemos estabelecer monocamadas celulares em tampão fisiológico ou em meio de cultura. Os hemócitos em monocamada apresentam uma taxa de sobrevivência de todo compatível com os testes que queremos realizar com os produtos bacteriohelmínticos.

* As células *SI2b* apresentam uma duração bastante mais importante do que os hemócitos *in vitro*, apesar de, as culturas primárias de hemócitos possuírem uma apreciável longevidade. A linhagem celular poderá ser utilizada para as incubações de maior duração. Poderão, igualmente, ser utilizadas para os estudos de especificidade da actividade dos factores isolados.

* Além disto, conhecemos o padrão médio de desenvolvimento larvar no que diz respeito ao número total e diferencial de hemócitos, ao peso e volume de hemolinfa das lagartas do sexto estado larvar das duas espécies analisadas em pormenor. Estes resultados permitir-nos-ão quantificar os efeitos *in vivo* sobre estas variáveis induzidas, designadamente, pela invasão bacteriana do hemocélio.

* Finalmente, a análise global destes resultados, permitiu a aquisição de critérios de selecção dos insectos utilizados nos bioensaios os quais recaíram em lagartas do segundo-terceiro dia de desenvolvimento.