

## **CAPÍTULO 2**

### **Detecção das Actividades Citolíticas ou Citotóxicas**

Pesquisou-se, no meio de incubação do complexo nematobacteriano, os eventuais factores solúveis excretados pelo par simbiote que poderiam possuir um efeito sobre as células imunocompetentes dos insectos, os hemócitos. Vários efeitos foram evidenciados que serão detalhados na primeira parte deste capítulo. De seguida, pesquisámos qual dos dois parceiros da simbiose, o nemátodo ou a bactéria, estava na origem da produção de alguns daqueles factores. Enfim, alguns dos factores bacterianos foram caracterizados dado que foi sobre eles que o seguimento do trabalho foi conduzido.

#### **2.1. Complexo simbiote holoxénico e monoxénico**

As condições em que se fez a produção do complexo simbiote holoxénico e monoxénico, *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophila*, revelaram-se muito satisfatórias e reprodutíveis na qualidade e quantidade dos nemátodos obtidos. A desinfecção em superfície dos nemátodos e o isolamento da bactéria simbiote (Material e Métodos; 1.2.2. e 1.2.3.) mostraram que são metodologias reprodutíveis quanto aos resultados esperados. Com efeito, estes procedimentos permitiram obter nemátodos holoxénicos em grande quantidade e o isolamento e identificação da bactéria em NBTA é segura e fiável, dada a facilidade com que se obtêm as colónias azuis da Fase I.

Nestas condições, a partir da constatação de que o nemátodo se encontrava monoxénico, tanto em exame microscópico das culturas como por crescimento das

colónias bacterianas em NA e/ou NBTA, realizaram-se os ensaios com grande margem de segurança e confiança no material biológico.

### **2.1.1. Detecção da actividade citolítica/citotóxica sobre hemócitos**

Os filtrados dos sobrenadantes dos meios de incubação do complexo simbiote, holoxénico e/ou monoxénico, (NMTH e NTSB) apresentaram actividade citolítica contra monocamadas de hemócitos de insectos. Foi possível detectar esta actividade pela constatação de que, quando colocados em presença daqueles sobrenadantes, os hemócitos revelavam uma mortalidade bastante acentuada.

Com efeito, quando o tampão fosfato salino ou o meio G3, respectivamente, das monocamadas extemporâneas, das culturas primárias de hemócitos ou das células *S12b*, era substituído pelos filtrados dos sobrenadantes das culturas do complexo nematobacteriano, observou-se que a mortalidade celular e/ou necrose celular, avaliada pelo ensaio da exclusão do azul Trypan, era muito importante. De facto, decorrida uma hora de incubação, todas as células se encontravam profundamente alteradas, com vacuolização acentuada, túrgidas e necrosadas, com o núcleo corado de azul. Em alguns ensaios, a observação em microscopia fotónica revelou a destruição pura e simples dos hemócitos aparecendo as poucas células ainda presentes, com aspecto ainda digno desse nome, com o núcleo corado de azul. A exploração das preparações revelou sistematicamente a existência de uma mortalidade celular generalizada e total onde era possível observar, nos casos mais drásticos, intensa flocação de restos de células à deriva no meio de montagem entre lâmina e lamela. Inversamente, nos ensaios testemunha, designadamente, aqueles em que foram utilizados os meios de cultura onde não tinha sido incubado o complexo simbiote, não se observou mortalidade hemocitária/celular.

Acrescenta-se que os filtrados dos sobrenadantes apresentavam, além da citólise e citotoxicidade, actividades enzimáticas do tipo proteásica, lipásica e fosfolipásica ou lecitínásica e, além destas, foram encontrados níveis de endotoxinas ou LPS significativos. Decorrente da estratégia de pesquisa

delineada foi decidido, em primeiro lugar, pesquisar as melhores condições de produção, pelo complexo nematobacteriano, do(s) factor(es) de citotoxicidade contra hemócitos de insectos lepidópteros; em segundo lugar, estudar a cinética de produção dos metabolitos responsáveis pelas diferentes actividades biológicas e enzimáticas; em terceiro lugar, separar cromatograficamente os factores responsáveis pela actividade citolítica e citotóxica e, por último, identificar e caracterizar molecularmente os metabolitos envolvidos.

### **2.1.2. Cinética de produção dos factores com actividades citotóxica e enzimática nos filtrados dos sobrenadantes dos meios de cultura do complexo simbiote**

Os nemátodos desenvolveram-se muito bem em qualquer um dos meios utilizados, NMTH ou NTSB. Ao fim de 8-12 h de incubação todos os nemátodos tinham perdido a sua cutícula supranumerária e observou-se um desenvolvimento progressivo e harmonioso destes vermes sem se constatar a menor anomalia relacionada com a viabilidade pois nunca existiram registos relacionados com a sua mortalidade.

A Tabela VI mostra a cinética de produção dos factores com actividades citolítica/citotóxica e enzimática (proteásica) de dois sobrenadantes de cultura do complexo simbiote holoxénico e/ou monoxénico (NMTH e NTSB). A percentagem de mortalidade total, a que se referem os resultados desta tabela, são os calculados em ensaios sobre monocamada de hemócitos de *G. mellonella*. No entanto, os ensaios efectuados sobre monocamadas de hemócitos de *M. unipuncta* e *S. littoralis* revelam o mesmo tipo e nível de citotoxicidade com percentagens de mortalidade muito semelhantes.

O resultado mais relevante é o da detecção da actividade citotóxica com início às 24-27 h pós-incubação atingindo o seu máximo a partir das 36-39 h. Este patamar máximo de actividade mantém-se, no mínimo, até às 60 h.

Quanto à detecção da actividade proteásica, constata-se que existem dois picos de produção em função do tempo de cultura. O primeiro expressa-se entre as 24 e 30 h de incubação, iniciando-se o segundo a partir das 40 h. Este segundo pico está sobreposto com o máximo de actividade citotóxica. De notar que enquanto a esta actividade se mantém no sobrenadante até, pelo menos, às 60 h, a actividade proteásica, por seu lado, apresenta um decréscimo acentuado a partir das 50 h.

A Tabela VII, por sua vez, fornece os resultados da avaliação da citotoxicidade dos NMTB e NTSB, entre as 39 e 60 h pós-incubação do complexo simbiote, em função da diluição. Neste quadro pode observar-se qual a máxima diluição em que ainda foi possível quantificar a percentagem de mortalidade do efeito citotóxico.

Pela análise comparativa das Tabelas VI e VII observa-se que existe uma produção de factores citotóxicos a partir das 24-27 h de incubação qualquer que seja o meio considerado. Parece poder inferir-se que estes factores são cumulativamente produzidos ao longo do tempo. Com efeito, é possível observar e quantificar percentagens de mortalidade superiores a 10% à medida que os sobrenadantes de cultura suportam um aumento cada vez maior das diluições. Assim, às 39 h de incubação, os sobrenadantes apresentam uma mortalidade de 100% mas só é possível efectuar uma diluição de 1/8 com cerca de 12% de mortalidade hemocitária. Por sua vez, o mesmo meio às 48 e 51 h de incubação, origina um sobrenadante que já suporta uma diluição de 1/64 para a qual é possível obter um valor médio próximo de 20% de mortalidade.

As Tabelas VIII e IX apresentam, respectivamente, a citotoxicidade média, quantificada em percentagem de mortalidade contra hemócitos de *G. mellonella* e *M. unipuncta*, do NMTB em função de dois parâmetros: diluição do NMTB e tempo de incubação com as monocamadas de hemócitos. Os resultados conjugados permitem inferir que i) é possível diluir oito vezes o sobrenadante e observar, ainda, 100% de mortalidade hemocitária. A diluição 1:64 possui uma actividade citotóxica responsável por uma mortalidade celular na ordem de 17%-21% e que ii) esta actividade faz sentir os seus efeitos cumulativos ao longo do tempo de

incubação com as células, ou seja, à medida que o tempo de incubação aumenta há um número cada vez maior de hemócitos que morrem.

**Tabela VI**

Cinética de produção dos factores citotóxicos e proteásicos, nos sobrenadantes das culturas NMTH e NTSB, em função do tempo de incubação do complexo simbiote monoxénico

<b>Tempo<sup>1</sup> (horas)</b>	<b>NMTH</b>		<b>NTSB</b>	
	<b>% Mortalidade<sup>2</sup></b>	<b>Actividade Proteásica<sup>3</sup></b>	<b>% Mortalidade<sup>2</sup></b>	<b>Actividade Proteásica<sup>3</sup></b>
<b>0-12</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>15</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>18</b>	<b>0</b>	<b>80±5,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>21</b>	<b>0</b>	<b>116±7,5</b>	<b>0</b>	<b>75±5,0</b>
<b>24</b>	<b>16,2±8,0</b>	<b>380±7,5</b>	<b>0</b>	<b>175±7,5</b>
<b>27</b>	<b>47,8±3,3</b>	<b>650±17,5</b>	<b>27,6±4,1</b>	<b>225±10,0</b>
<b>30</b>	<b>68,6±4,8</b>	<b>650±25,0</b>	<b>55,1±6,3</b>	<b>525±17,5</b>
<b>33</b>	<b>86,4±10,8</b>	<b>82±7,5</b>	<b>77,2±6,1</b>	<b>50±5,0</b>
<b>36</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>50±10</b>	<b>97,3±12,6</b>	<b>25±5,0</b>
<b>39</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>1500±150</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>1000±100</b>
<b>42</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>8500±250</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>6000±500</b>
<b>45</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>&gt;10000</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>8000±500</b>
<b>48</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>&gt;10000</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>&gt;10000</b>
<b>51</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>&gt;10000</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>&gt;10000</b>
<b>60</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>4250±100</b>	<b>100<sup>4</sup></b>	<b>2850±50</b>

<sup>1</sup> Tempo de cultura do complexo simbiote em MTH e TSB

<sup>2</sup> Citotoxicidade expressa em percentagem de mortalidade total de hemócitos de *G. mellonella* (Média±desvio padrão; n=6)

<sup>3</sup> Unidades equivalentes de actividade proteásica da tripsina (Ueq). Uma solução de tripsina a 1 mg/mL possui 10000 U unidades de actividade proteásica (unidade definida para a tripsina pela Comissão Enzimática EC3.4.21.4)

<sup>4</sup> Sobrenadantes com 1,0 unidade de actividade hemolítica (UAH)

Além destes efeitos citotóxicos, revelados e caracterizados pelo ensaio da exclusão do azul Trypan, notou-se que existem numerosas células não aderentes à superfície do suporte de montagem. Este efeito, era mais evidente quando se observavam os hemócitos incubados em função do tempo ou da diluição do

sobrenadante. No primeiro caso, entre os 15 min e os 45 min pós incubação nota-se o aumento da mortalidade mas constata-se que existe um número cada vez maior de células descoladas e a flutuar no meio de montagem. De igual modo, para diluições intermédias situadas entre 1/16 e 1/64 também se observou o fenómeno de hemócitos redondos e descolados do suporte. No entanto, tanto num caso como noutra as células não se encontravam azuis. Postulou-se, na ocasião, a eventualidade de se tratarem de efeitos intermédios da actividade citolítica ou de um outro factor de citotoxicidade.

**Tabela VII**

Citotoxicidade dos sobrenadantes das culturas NMTH e NTSB, em função do tempo de incubação do complexo simbiote monoxénico e da diluição

<b>Tempo<sup>1</sup></b> <b>(horas)</b>	<b>NMTH</b>		<b>NTSB</b>	
	<b>Diluição<sup>2</sup></b>	<b>% Total de Mortalidade<sup>3</sup></b>	<b>Diluição<sup>2</sup></b>	<b>% Total de Mortalidade<sup>3</sup></b>
<b>39</b>	<b>1/8</b>	<b>12,3±5,4</b>	<b>1/4</b>	<b>11,3±6,0</b>
<b>42</b>	<b>1/32</b>	<b>9,8±4,4</b>	<b>1/32</b>	<b>10,1±5,6</b>
<b>45</b>	<b>1/32</b>	<b>16,5±3,4</b>	<b>1/32</b>	<b>15,0±3,7</b>
<b>48</b>	<b>1/64</b>	<b>18,7±6,1</b>	<b>1/64</b>	<b>19,3±3,5</b>
<b>51</b>	<b>1/64</b>	<b>19,5±11,1</b>	<b>1/64</b>	<b>17,8±9,9</b>
<b>60</b>	<b>1/64</b>	<b>17,3±8,2</b>	<b>1/64</b>	<b>15,0±5,6</b>

1 Tempo de incubação do complexo simbiote nos meios de cultura

2 Diluição máxima do sobrenadante do meio de cultura em que foi possível detectar e quantificar a percentagem de mortalidade. A diluição seguinte não apresenta mortalidade ou esta é vestigial, <2%.

3 Citotoxicidade expressa em percentagem de mortalidade total de hemócitos de *G. mellonella* (Média±desvio padrão; n=4)

**Tabela VIII**

Citotoxicidade dos sobrenadantes das culturas do complexo simbiote monoxénico (NMTH) em função da diluição em PBS

<b>Diluições<sup>1</sup> (NMTH)</b>	<b>% de Mortalidade total de hemócitos<sup>2</sup></b>	
<b>1/2</b>	<b>100<sup>a</sup></b>	<b>100<sup>b</sup></b>
<b>1/4</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>1/8</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>1/16</b>	<b>89,6±5,9</b>	<b>93,2±2,1</b>
<b>1/32</b>	<b>45,0±20,6</b>	<b>52,1±4,6</b>
<b>1/64</b>	<b>17,6±12,5</b>	<b>21,4±3,3</b>
<b>1/128</b>	<b>&lt;2</b>	<b>&lt;5</b>
<b>1/256</b>	<b>&lt;2</b>	<b>&lt;2</b>
<b>Testemunha<sup>3</sup></b>	<b>&lt;2</b>	<b>&lt;2</b>

1 Diluições em PBS do NMTH

2 Citotoxicidade expressa em percentagem de mortalidade total de hemócitos de a) *M. unipuncta* e b) *G. mellonella* (Média±desvio padrão; n=30)

3 Meio estéril, não incubado e diluído em PBS (1:1)

**Tabela IX**

Citotoxicidade dos sobrenadantes das culturas do complexo simbiote monoxénico (NMTH) em função do tempo de incubação com os hemócitos

<b>Tempo de Incubação em NMTH<sup>1</sup> (min)</b>	<b>% de Mortalidade total de hemócitos<sup>2</sup></b>	
<b>15</b>	<b>3,0±1,8<sup>a</sup></b>	<b>5,0±2,1<sup>b</sup></b>
<b>30</b>	<b>31,4±2,2</b>	<b>43,3±3,8</b>
<b>45</b>	<b>78,7±3,1</b>	<b>80,8±7,1</b>
<b>60</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Testemunha<sup>3</sup></b>	<b>&lt;2</b>	<b>&lt;2</b>

1 NMTH diluído 1/4 em PBS

2 Citotoxicidade expressa em percentagem de mortalidade total de hemócitos de a) *M. unipuncta* e b) *G. mellonella* (Média±desvio padrão; n=30)

3 Meio estéril diluído em PBS (1:1)

### 2.1.3. Análise cromatográfica dos sobrenadantes dos meios de cultura do complexo simbiote

A Fig.13 mostra o fluxograma da separação cromatográfica dos factores com actividades biológica e enzimática detectadas nos sobrenadantes de cultura de complexo simbiote, respectivamente, NMTH e NTSB. Por sua vez, os Cromatogramas 1 e 2 representam os correspondentes perfis das cromatografias de troca aniónica (Mono Q 5/5).

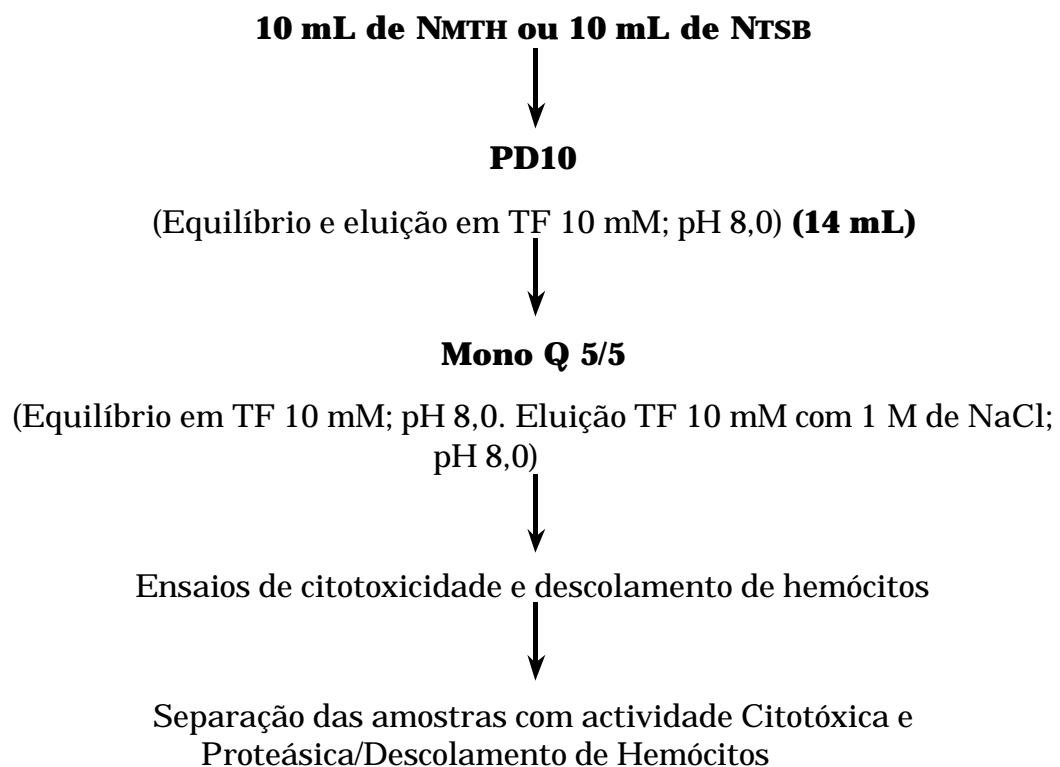


Fig. 13 - Fluxograma da separação cromatográfica dos factores com actividade citotóxica e proteásica existentes nos sobrenadantes de cultura do complexo simbiote (NMTH e NTSB). As fracções com actividades biológicas e enzimáticas, depois de cromatograficamente separadas uma da outra, são individualmente congeladas em azoto líquido e liofilizadas.

A análise destes cromatogramas revelou que as fracções com actividade citotóxica/citolítica se encontravam muito bem separadas das fracções com

actividades proteásicas, designadamente, da principal fracção responsável pelo descolamento de hemócitos.

De acordo com a metodologia seguida, as actividades biológicas e enzimáticas, foram pesquisadas em todas as fracções das cromatografias. As actividades biológicas foram testadas sobre monocamadas de hemócitos e identificaram-se fracções responsáveis pela mortalidade celular. A pesquisa das actividades enzimáticas também revelou a existência de fracções positivas, designadamente, quanto à actividade proteásica.

### **2.1.3.1. Actividade Citolítica/Citotóxica**

As análises aos perfis cromatográficos (Cromatogramas. 1 e 2) revelaram que, na zona da eluição do gradiente correspondente a 160-180 mM de NaCl, foram identificadas três fracções responsáveis pela morte celular. Com efeito, foi possível desenhar um pico de actividade citotóxica em que, pelo menos, uma das fracções era responsável pela mortalidade total das células.

A Tabela X apresenta os resultados da quantificação da citotoxicidade diferencial da fracção responsável por 100% de mortalidade hemocitária, em função da duração do tempo de incubação. As testemunhas foram as fracções imediatamente vizinhas das que apresentavam o efeito citolítico. Como facilmente se pode constatar, os plasmatócitos e os granulócitos, não apresentaram a mesma sensibilidade aos factores citotóxicos.

A análise dos resultados inseridos na Tabela XI, em que a citotoxicidade está expressa em função do aumento do factor de diluição em PBS, torna evidente que são os hemócitos granulares ou granulócitos as células mais sensíveis e as células esféricas as menos atingidos pela mortalidade. Este facto é mais evidente à medida que se diminui o factor de diluição da fracção activa. Nas diluições em que o factor é mais elevado (1/64 e superiores), os hemócitos apresentaram-se com o seu aspecto normal, não corados pelo azul Trypan, podendo ser comparados com as células dos ensaios testemunha, (Fig. 14a). Após incubação nas diluições 1/34, alguns hemócitos, em especial, os granulócitos, apareciam como células arredondadas, com o citoplasma vacuolizado e também coradas pelo azul Trypan.

Os vacúolos encontravam-se localizados nas proximidades do núcleo sugerindo que poderiam ter tido a sua origem nas dilatações das cisternas perinucleares.

### Tabela X

Sensibilidade diferencial dos hemócitos de *M. unipuncta* e *G. mellonella* às fracções citotóxicas das cromatografias Mono Q 5/5 de NMTH em função do tempo de incubação

Tempo de incubação (min) <sup>1</sup>	% de Mortalidade diferencial de hemócitos <sup>2</sup>	
	Granulócitos	Plasmatócitos
15	4,2±2,0 <sup>a</sup> / 2,7±1,0 <sup>b</sup>	<1 <sup>a</sup> / <1 <sup>b</sup>
30	45,4±3,8 / 39,7±4,9	13,8±1,3 / 12,5±1,1
45	95,2±3,9 / 91,5±5,1	71,7±5,2 / 65,6±3,8
60	100 / 100	100 / 100
Testemunha	<1	<1

1 Tempo de incubação dos hemócitos de a) *M. unipuncta* e b) *G. mellonella* com as fracções citotóxicas das cromatografias Mono Q 5/5 dos sobrenadantes de cultura de NMTH

2 Citotoxicidade expressa em percentagem de mortalidade diferencial de hemócitos (Média±desvio padrão; n=5).

### Tabela XI

Sensibilidade dos diferentes tipos de hemócitos de *M. unipuncta* e *G. mellonella* às fracções com actividade citotóxica das cromatografias Mono Q 5/5 de NMTH

Diluições de NMTH em PBS <sup>1</sup>	% de Mortalidade diferencial de hemócitos <sup>2</sup>		
	Granulócitos	Plasmatócitos	Células esféricas
1/2	100 <sup>a</sup> / 100 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup> / 100 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup> / 100 <sup>b</sup>
1/4	100 / 100	100 / 100	60,0±8,8 / 53,5±4,2
1/8	67,3±9,3 / 65,1±10,3	21,0±1,9 / 20,7±1,2	3,3±0,1 / 1,3±0,2
1/16	20,1±1,1 / 25,6±1,3	2,7±0,6 / 3,3±1,5	<2
1/32	3,3±0,3 / 4,2±1,6	<2	NT
1/64	<2	<2	NT
1/128	<2	<2	NT
Testemunha	<2	<2	<2

1 Diluições em PBS das fracções cromatográficas com actividade citotóxica. Cromatografias Mono Q 5/5 dos sobrenadantes de cultura de NMTH

2 citotoxicidade expressa em percentagem de mortalidade diferencial de hemócitos de a) *M. unipuncta* e b) *G. mellonella*, (Média±desvio padrão; n=10)

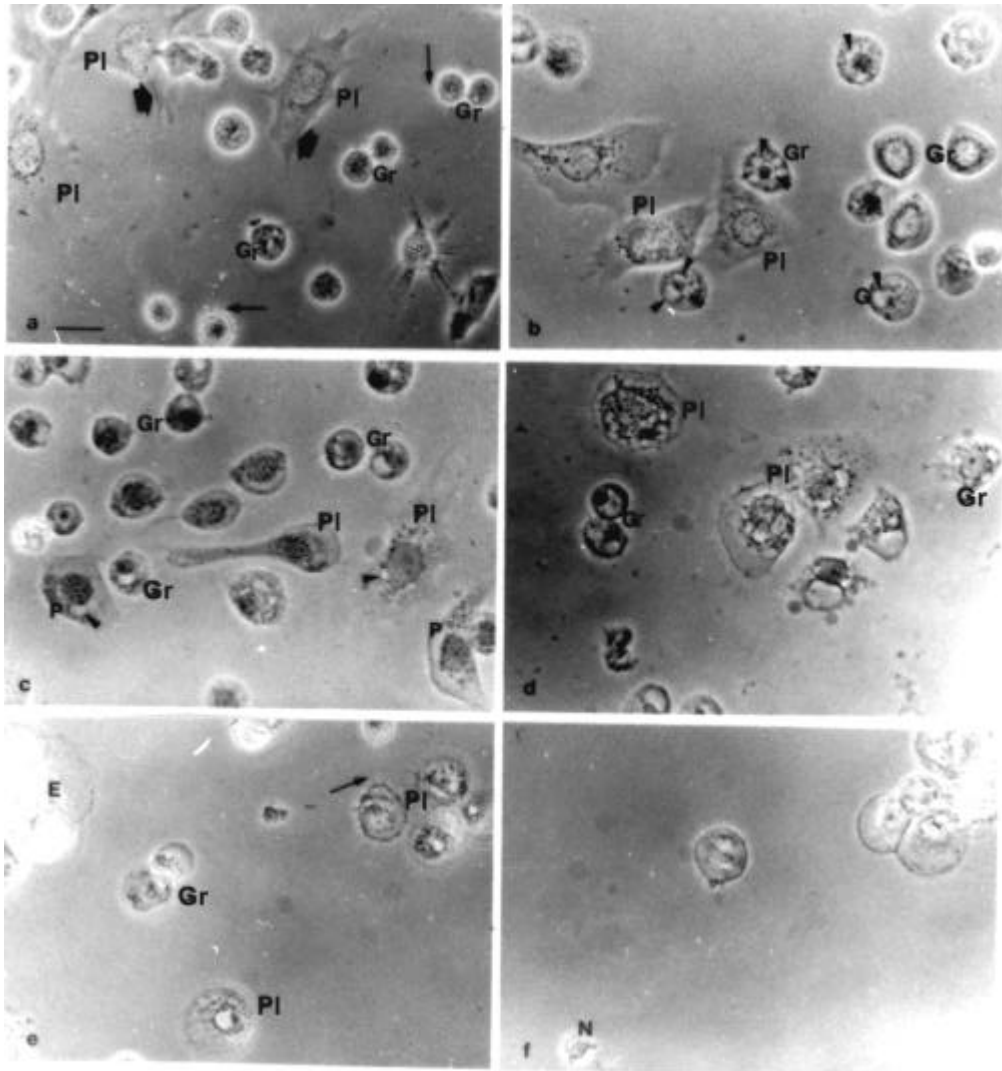


Fig. 14 - Actividade citotóxica do meio de incubação NMTH ou das fracções das cromatografia Mono Q 5/5. As monocamadas de hemócitos foram incubadas durante 1 hora e observadas sob contraste de fase. Em **a** as células que servem de testemunhas incubaram com o meio MTH nativo e estéril, não incubado com o complexo nematobacteriano. Os Plasmatócitos apresentam o seu comportamento fibroblástico (Pl) com lamelipodia (seta grande). Os Granulócitos são células redondas, com a periferia refringente e finos filipodia. Em **b** as células incubaram com a fracção activa da cromatografia Mono Q do NMTH diluída 1/16 em PBS. Os Granulócitos apresentam-se vacuolizados e os vacúolos parecem estar em contacto com o núcleo. Em **c** a incubação das células foi feita na mesma fracção diluída 1/8 e os vacúolos começam a aparecer nos Plasmatócitos. Em **d** e **e** as diluições são de 1/4 e 1/2, respectivamente, e os hemócitos são células túrgidas e observam-se numerosos restos celulares.

Outros hemócitos, em particular, os plasmatócitos, não apresentavam estas modificações e também não estavam corados pelo azul Trypan sendo, por isso, consideradas como células viáveis, (Fig. 14b).

Com a diminuição do factor de diluição para 1/16 (Fig. 14c) os efeitos citotóxicos começaram a ser mais evidentes nos granulócitos, com mortalidade na ordem de 20% e nos plasmatócitos na de  $\pm 3\%$ , generalizando-se aos outros tipos de células, designadamente, às células esféricas. Nas diluições 1/8 (Fig. 14d) os vacúolos também já eram bem evidentes nos plasmatócitos e a percentagem de mortalidade destes hemócitos mostrava-se significativa, ascendendo a  $\pm 21\%$ , enquanto que a dos granulócitos era de  $\pm 67\%$ , (Tabela XI). Nas diluições de 1/4 o número e a dimensão dos vacúolos celulares aumentou significativamente em todos os hemócitos. A maioria das células estavam mortas, com o núcleo corado de azul e com aspecto que sugeria o de núcleos picnóticos, (Fig. 14e). Exceptuando algumas células esféricas, cuja percentagem de mortalidade era de  $\pm 60\%$ , todos os outros hemócitos estavam mortos. Finalmente, na diluição 1/2, a percentagem de mortalidade ascendia a 100%, os hemócitos estavam uniformemente arredondados, vacuolizados e não era possível distinguir os granulócitos dos plasmatócitos, (Fig. 14f).

### **2.1.3.2. Actividade Proteásica ou de Descolamento de Hemócitos**

A observação de que existiam hemócitos descolados da superfície de aderência, enquanto em contacto com os sobrenadantes dos meios de incubação do complexo simbiote, foi corroborada pelos resultados obtidos decorrentes do ensaio de incubação das monocamadas de hemócitos com as diferentes fracções das cromatografias Mono Q 5/5 NMTH e NTSB.

As cromatografias de troca aniónica (Mono Q 5/5) dos sobrenadantes de cultura NMTH e NTSB originaram fracções que apresentavam actividade de descolamento sobre hemócitos (Fig. 15a,b). Estas fracções obtêm-se na eluição do gradiente salino entre 440-480 mM de NaCl (Cromatogramas 1 e 2) e apresentam, também, actividade proteásica na ordem de  $625 \pm 50$  U, (unidades equivalentes da actividade proteásica da tripsina).

Em primeiro lugar, na pesquisa da actividade de descolamento, avaliaram-se os efeitos de todas as fracções das cromatografias sobre monocamadas de hemócitos e, em segundo lugar, efectuaram-se as detecções das

actividade enzimáticas, constatando-se que as fracções responsáveis pela indução de desaderência celular possuíam actividade proteásica. Por último, identificadas as fracções responsáveis pelo descolamento, fizeram-se diluições em PBS (1:1) das fracções positivas e calculou-se a correspondente percentagem diferencial de desaderência em função do tempo de incubação e os resultados estão expressos na Tabela XII. Nota-se que a actividade enzimática induz o descolamento diferencial de hemócitos e é evidente que os plasmatócitos são o alvo celular preferencial (Fig. 15b). Com efeito, aos 60 min de incubação, mais de 80% das células (granulócitos + plasmatócitos) estão descoladas sendo este número, maioritariamente, devido aos plasmatócitos (>60%).

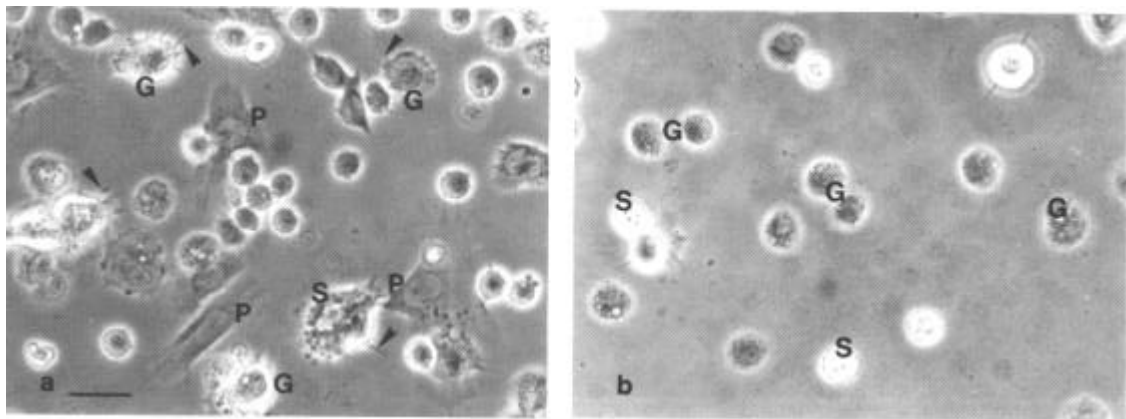


Fig. 15 – Actividade de descolamento de hemócitos das fracções com actividade proteásica obtidas das cromatografias Mono Q 5/5 do meio de incubação NMTH. Em **a** observam-se as monocamadas de hemócitos testemunha apresentam o aspecto normal, plasmatócitos fibroblásticos e granulócitos com numerosos filipodia. Após 1 hora de incubação com as fracções com actividade proteásica, diluídas 1/2 em PBS, nota-se que os plasmatócitos já não estão presentes e que os granulócitos, em menor número, perderam os filipodia.

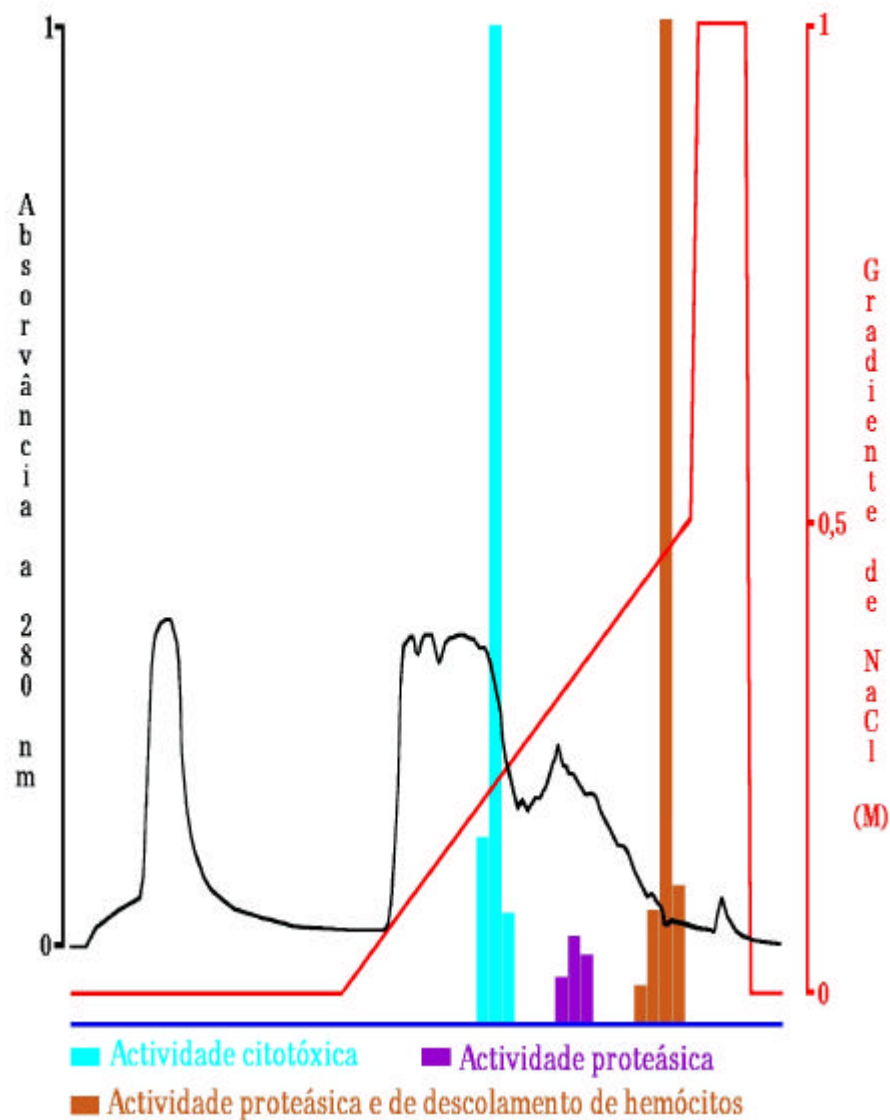
Quando os hemócitos de insectos são incubados em PBS sobre lâminas ou lamelas de vidro as células aderem rapidamente à sua superfície e adquirem formas bastante características. Os plasmatócitos apresentam-se com amplas formas fibroblásticas, ocupando uma extensa superfície com lamelas de citoplasma bem desenvolvidas, enquanto que os granulócitos mantêm a sua forma arredondada característica, envolvidos por curtos e numerosos filamentos de citoplasma, (Fig. 15a).

Nos ensaios *in vitro* em que se observaram os efeitos de descolamento os hemócitos, em particular, os plasmatócitos e os granulócitos, vão perdendo o seu perfil característico de células com contornos irregulares, com a emissão de numerosos pseudópodes e filamentos citoplasmáticos e, ao fim de 30-45 min de incubação, apresentavam-se arredondadas. No final do tempo consagrado à incubação e após a inversão das lamelas sobre as lâminas escavadas, observou-se que um grande número de células estavam desaderentes da lamela e encontrando-se depositadas no fundo da concavidade da lâmina. A percentagem total de descolamento é da ordem de 80-90% sendo a maioria desta percentagem devida aos plasmatócitos.

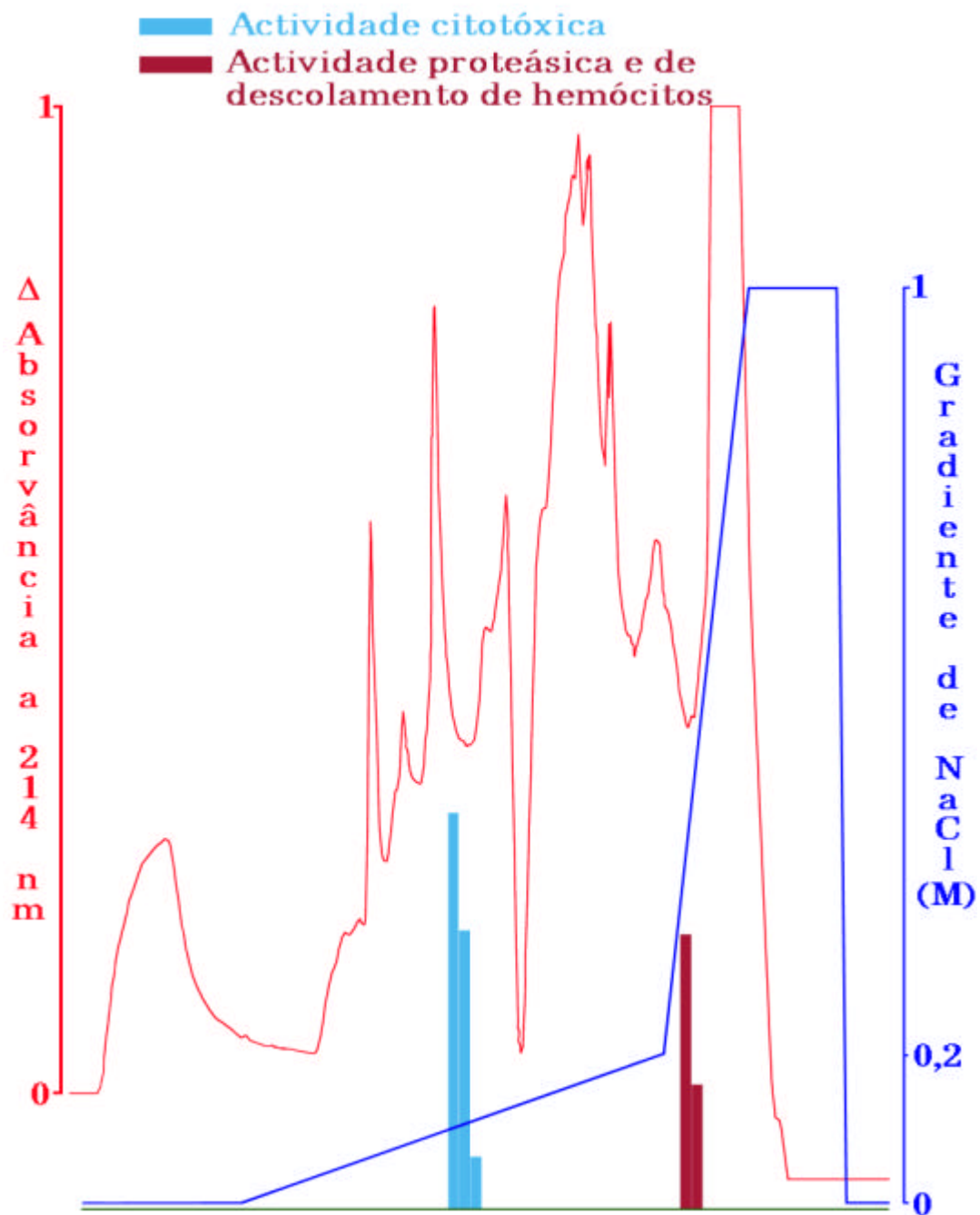
A Tabela XII mostra a percentagem diferencial de descolamento dos hemócitos de *M. unipuncta* e *G. mellonella* em função do tempo de incubação com as fracções com actividade proteásica da cromatografia Mono Q 5/5 do sobrenadante da cultura NMTH. De notar que, após 30 e 60 min de incubação, o cálculo da percentagem de viabilidade do conjunto total destas células é bastante elevada, respectivamente, de 98% e 95%. A observação das células mostra que não se encontram coradas pelo azul Trypan sendo, por isso, consideradas como células vivas. Estes níveis de viabilidade são semelhantes aos das testemunhas incubadas em PBS ou nas fracções contíguas da cromatografia isentas da actividade. Os ensaios sobre hemócitos de *S. littoralis* apresentam níveis de descolamento celular total e diferencial semelhantes aos obtidos para *M. unipuncta* e *G. mellonella*.

Na vertente da caracterização dos factores responsáveis pelas actividades proteásica e de descolamento de hemócitos efectuou-se o estudo da sua resistência a factores físicos e a constatou-se que, após diálise em membrana com 10 kDa, tinham sido conservadas ambas as actividades. No entanto, a pesquisa da resistência à temperatura mostrou que as iguais ou superiores a 45°C eram totalmente limitante para ambas as actividades.

De assinalar, porém, que existe mais uma zona, no gradiente de eluição salino, (Cromatograma 1), onde é possível detectar tanto a actividade proteásica como a de descolamento de hemócitos. No entanto, dados os níveis muito fracos de ambas o seu estudo não foi prosseguido.



Cromatograma 1 – Perfil da cromatografia de troca aniônica Mono Q 5/5 NMTH, do meio com 48 h de incubação do complexo nematobacteriano. A atividade citolítica e a de descolamento de hemócitos correspondem a 100% de mortalidade e desaderência celular. A leitura da absorvância a 280 nm está representada pela linha preta e a vermelha configura o gradiente de NaCl, com um fluxo de 20 mM/min entre 0-0,5M.



Cromatograma 2 – Perfil da cromatografia de troca aniônica Mono Q 5/5 NTSB, do meio com 48 h de incubação do complexo nematobacteriano. A actividade citolítica e a de descolamento de hemócitos correspondem a 100% de mortalidade e desaderência celular. A leitura da absorvância a 214 nm está representada pela linha vermelha e a azul configura o gradiente de NaCl, com um fluxo de 20 mM/min entre 0-0,2M.

**Tabela XII**

Descolamento diferencial de hemócitos em função do tempo de incubação com as fracções com actividade proteásica das cromatografias Mono Q 5/5 de NMTH (diluição 1:1 em PBS)

Tempo (minutos)	% de Células descoladas <sup>1</sup>	
	Granulócitos	Plasmatócitos
	0	<3
30	11,3±5,8 <sup>a</sup> / 10,4±3,7 <sup>b</sup>	26,0±12,1 <sup>a</sup> / 25,5±6,3 <sup>b</sup>
45	15,2±4,7 / 14,6±2,2	32,5±13,2 / 31,0±7,8
60	20,1±3,1 / 19,1±1,0	61,7±8,1 / 63,3±5,7
Testemunha <sup>2</sup>	<2	<2

1 Percentagem diferencial de descolamento de hemócitos de a) *M. unipuncta* e b) *G. mellonella*, (Média±desvio padrão; n=30)

2 Fracções cromatográficas contíguas sem actividade

### 2.1.3.3. Actividade Lipásica e Fosfolipásica/Lecitinásica

Apesar de, nos sobrenadantes de cultura do complexo simbiote, terem sido detectadas as actividades lipásica e lecitínica os ensaios elaborados sobre as fracções com as actividades proteásicas (responsáveis pelo descolamento de hemócitos) e citolíticas/citotóxicas, revelaram que estas fracções não possuem quaisquer outras actividades.

### 2.1.3.4. Detecção de endotoxinas/LPS

Foram detectados níveis idênticos e uniformes de endotoxinas ou LPS em todas as fracções cromatográficas, incluindo as que não possuíam actividades biológicas ou enzimáticas, assim como, nas diferentes soluções tampão utilizadas e nos meios de cultura testemunha onde não foi efectuada a incubação dos nemátodos. No entanto, não foi possível associar a presença de LPS com as actividades estudadas porque, em nenhuma destas soluções ou meios, foram detectados quaisquer efeitos citolíticos/citotóxicos, descolamento/desaderência de hemócitos ou actividades enzimáticas pesquisadas. Em resumo: nas testemunhas negativas, isentas de quaisquer uma das actividades em estudo, foram sempre detectados níveis de endotoxinas/LPS.

### 2.1.4. Perda das actividades com o tempo de conservação dos nemátodos holoxénicos e monoxénicos

Algumas observações casuísticas permitiram constatar que a mortalidade dos nemátodos aumentava com o tempo de armazenamento. Este resultado, porém, não foi objecto de quantificação no presente trabalho, mas foi tido em conta nos momentos de decisão sobre a eventual utilização das populações helmínticas nos ensaios. Com base neste tipo de resultados foram efectuados controlos complementares sobre a eventual perda da virulência ou da capacidade de produção dos metabolitos citotóxicos/citolíticos do par bacterio-helmíntico.

Estes controlos mostraram ter sido necessários, dado que, na Tabela XIII, está expressa a perda de citotoxicidade dos sobrenadantes da cultura do complexo simbiote em MTH (NMTH) dependente do tempo de armazenamento dos nemátodos. Com efeito, notou-se um decréscimo da citotoxicidade do NMTH quando se efectuavam os ensaios sobre monocamadas de hemócitos.

**Tabela XIII**

Perda de Citotoxicidade dos sobrenadantes das culturas do complexo simbiote monoxénico (NMTH) em função do tempo de armazenamento dos nemátodos

Tempo de armazenamento dos nemátodos (meses)	% de Mortalidade total de hemócitos <sup>1</sup>	
	Diluição 1/4 <sup>2</sup>	Diluição 1/8 <sup>2</sup>
<b>1</b>	<b>100<sup>3</sup></b>	<b>100<sup>3</sup></b>
<b>2</b>	<b>100<sup>3</sup></b>	<b>100<sup>3</sup></b>
<b>3</b>	<b>100<sup>3</sup></b>	<b>100<sup>3</sup></b>
<b>6</b>	<b>97,1±2,0<sup>3</sup></b>	<b>50,4±8,7<sup>3</sup></b>
<b>12</b>	<b>49,4±9,7<sup>4</sup></b>	<b>25,3±1,3<sup>4</sup></b>
<b>18</b>	<b>0<sup>5</sup></b>	<b>0<sup>5</sup></b>

1 Citotoxicidade expressa em percentagem de mortalidade total de hemócitos de *G. mellonella* (Média±desvio padrão)

2 Diluições do NMTH em PBS

3 Cinco observações independentes, (n=5)

4 Três observações independentes, (n=3)

5 Uma única observação, (n=1)

Esse decréscimo foi evidente quando se analisou a percentagem de mortalidade hemocitária consoante a diluição do sobrenadante. Em consequência foi decidido otimizar e uniformizar o intervalo de segurança, aumentando a confiança no material biológico e, por conseguinte, evitar resultados menos satisfatórios na produção de metabolitos citolíticos/citotóxicos, nunca se utilizaram nemátodos cujo tempo de armazenamento excedia um mês após um ciclo de parasitismo. No entanto, para a produção dos sobrenadantes de cultura destinados às cromatografias que conduziram à separação e estudo da citolisina/citotoxina os nemátodos foram utilizados imediatamente após um ciclo de parasitismo, (Material e Métodos; 1.2.1.) ou após a obtenção de nemátodos controladamente monoxénicos, (Material e Métodos; 1.4.).

### **2.1.5 Conclusão**

Constatou-se que foram produzidas diferentes actividades citotóxicas sobre hemócitos de insectos, além de, várias actividades enzimáticas. Parece evidente que, todas as actividades encontradas, participam nos mecanismos de virulência e conferem o poder entomopatogénico a este complexo. Em conformidade tornou-se necessário conhecer um pouco melhor estes factores: Foi nesta óptica que o nosso trabalho prosseguiu e, antes de caracterizar e, eventualmente purificar, os factores responsáveis pelas diferentes actividades, tornou-se necessário definir com precisão qual dos dois parceiros da simbiose os tinha produzido.

## **2.2. Factores produzidos por *S. carpocapsae* axénico**

Os nemátodos axénicos foram obtidos em grande quantidade, o controlo da axenia mostrou ser eficaz, dado que, não se observou crescimento bacteriano nos meios de cultura líquidos MTH, LB e TSB, nas geloses de ágar nutritivo ou em NBTA e, por isso, puderam efectuar-se os ensaios com segurança e fiabilidade.

### **2.2.1. Detecção da actividade citolítica/citotóxica sobre hemócitos**

Os resultados mostraram que os nemátodos axénicos não se desenvolveram *in vitro* em nenhum dos meios utilizados (ScMTH ou ScTSB). Os sobrenadantes dos meios de cultura do nemátodo axénico não apresentaram qualquer uma das actividades citotóxica/citolítica, descolamento de hemócitos ou enzimáticas pesquisadas a não ser num caso particular em que se obteve actividade proteásica fraca. De facto, quando se pesquisou esta actividade, nos sobrenadantes da cultura onde incubou uma população heterogénea de nemátodos axénicos com vários estados larvares, observou-se a detecção de actividade proteásica, na ordem de  $75 \pm 15$  U (unidades equivalentes de actividade proteásica da tripsina) para incubações que, em média, duraram 192 h, (8 dias). Observou-se, também, que as larvas do quarto estado e os adultos iam morrendo ao longo do tempo de incubação.

No entanto, quando a incubação se fez somente com nemátodos no estado de juvenis infectantes, os sobrenadantes dos meios cultura não apresentaram nenhuma actividade biológica ou enzimática detectável pelos métodos utilizados. Este resultado é corroborado pela observação de que os nemátodos não perderam a sua cutícula supranumerária e, por isso, nem sequer se desenvolveram mantendo-se no estado de resistência trófica.

### **2.3. Factores produzidos por *X. nematophila***

A metodologia para a obtenção de *X. nematophila* (Material e Métodos; 1.2.3.) revelou-se fiável e reprodutível dada a facilidade com que se obtiveram as colónias azuis da fase I. A este resultado acrescentou-se a facilidade experimental que relevou do facto de existir uma estirpe de *X. nematophila*, denominada F1/1, isolada do nemátodo *S. carpocapsae* e caracterizada no Laboratório de acolhimento em França.

### **2.3.1. Obtenção e optimização de um teste para a detecção rápida das actividades citolítica e citotóxica: Hemólise em meio líquido**

Com o avançar dos estudos tornou-se premente a pesquisa de um método alternativo à detecção da necrose celular por citólise/citotoxicidade recorrendo à monocamadas de hemócitos. Este método, embora insubstituível, revelou-se pesado pela manipulação cuidada e demorada que exigia e, por conseguinte, fastidioso e lento, nada prático para se processarem inúmeras amostras simultânea, rápida e diariamente. Relembre-se a propósito que a quantidade média de fracções a analisar por cada cromatografia era de cinquenta.

Neste contexto, desenvolveu-se um método alternativo às monocamadas de hemócitos que foram substituídas por hemácias. Os ensaios de hemólise em meio líquido revelaram-se muito eficazes e de rápida execução, permitindo o processamento de um número bastante elevado de amostras por dia. Com efeito, observou-se que as fracções com actividade biológica contra hemócitos possuíam, também, actividade hemolítica contra hemácias de várias proveniências animais. A partir da constatação de que existia uma sobreposição absoluta e nítida entre as actividades citolítica/citotóxica e a hemolítica, efectuou-se a adopção deste último teste para detectar a presença dos factores responsáveis pela morte celular.

O teste hemolítico caracterizou-se por ser um ensaio rápido, cómodo e fiável que permitiu um enorme avanço na pesquisa, optimização da produção dos factores citolíticos/citotóxicos e na sua subsequente separação e purificação.

Acresce que, os sobrenadantes da cultura do complexo simbiote, em análises e verificações retrospectivas, também apresentaram actividade hemolítica contra hemácias, designadamente, as de carneiro cuja cinética, nos sobrenadante NMTB e NTSB, acompanha e se sobrepõe à da actividade citolítica/citotóxica contra hemócitos de insectos. A partir das 39 h de incubação aqueles sobrenadantes provocam a hemólise total de hemácias de carneiro. Por seu turno, foram também testadas as fracções cromatográficas que apresentavam actividade proteásica/descolamento de hemócitos e os ensaios para a detecção da

actividade hemolítica revelam-se negativos, assim como, já o tinham sido os ensaios sobre hemócitos.

As incontáveis vezes em que este teste foi utilizado e a reprodutibilidade dos seus resultados, permitiram razoavelmente assumir que se estava perante um factor de citotoxicidade contra hemócitos de lepidópteros o qual era simultaneamente activo contra alguns tipos de hemácias de mamíferos. De qualquer modo, os ensaios sobre as monocamadas de hemócitos nunca deixaram de ser utilizados e a verificação da citotoxicidade, dos sobrenadantes de cultura e/ou as fracções de cromatografia positivas ao ensaio hemolítico, foram sempre controlada por exposição aos hemócitos em monocamadas.

A Fig. 16 mostra o gráfico da recta de calibração da actividade hemolítica e, da sua análise, ressalta que os resultados da hemólise, quantificados em variação da absorvância dos sobrenadantes ( $Abs_{540}$ ), obtidos durante os ensaios, não são directamente proporcionais em função das diluições das amostras activas.

Com efeito, as amostras que provocavam hemólise total, por exemplo, das hemácias de carneiro, originaram sobrenadantes com valores médios da densidade óptica de 0,720 Abs a 540 nm. Quando se efectuaram as diluições de 1/2 e 1/4 da mesma amostra verificou-se que a densidade óptica média dos sobrenadantes era de 0,620 Abs e 0,520 Abs, respectivamente. Continuando as diluições das amostras activas verificou-se que em nenhum intervalo a recta se comportava de um modo directamente proporcional e, por conseguinte, os resultados não puderam, então, ser referidos em percentagem de hemólise.

A Fig. 17 representa a recta semi-logarítmica de calibração em que o título da hemólise foi expresso em unidades de actividade hemolítica (UAH) que se pode calcular a partir da fórmula:

$$\text{Unidades de Actividade Hemolítica} = 2e(10^{*(DO-0,720)})$$

deduzida de numerosas determinações da absorvância da actividade hemolítica, usando diluições aritméticas de soluções activas. O mínimo de actividade hemolítica detectável por este método é 0,005 UAH.

A variável designada por DO é o valor da densidade óptica da amostra a quantificar e o valor 0,720 corresponde à absorvância originada por uma amostra capaz de induzir hemólise total (=1 UAH).

Por vezes, obtiveram-se amostras diluídas duas a quatro vezes que apresentavam, ainda, valores de hemólise total. Para integrar e facilitar a análise dos resultados, de amostras positivas com valores de hemólise superiores à unidade, postulou-se que os valores utilizados para quantificar as UAH seriam iguais ao número de vezes em que era possível diluir a amostra mantendo o resultado correspondente à hemólise total.

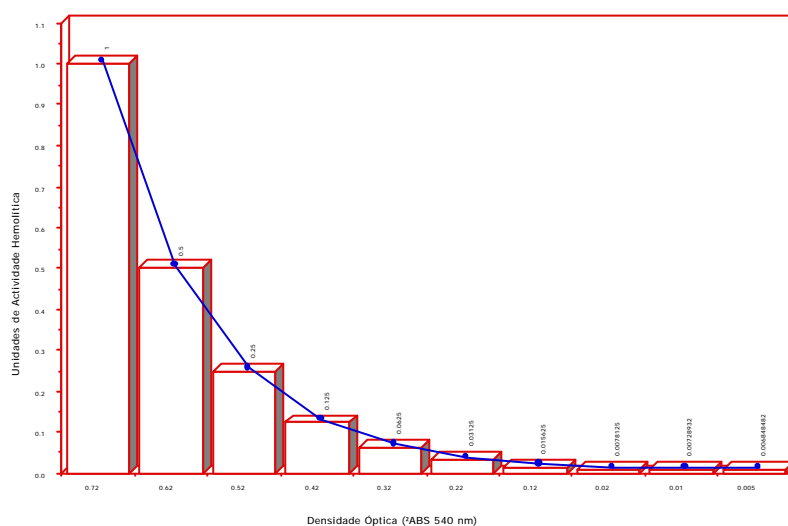


Fig. 16 - Actividade hemolítica em função das diluições de amostras positivas. A recta de calibração Abs<sub>540</sub> não apresenta uma variação directamente proporcional entre as diluições das amostras e a densidade óptica dos sobrenadantes. Título em unidades de actividade hemolítica calcula-se a partir da fórmula: Unidades de Actividade Hemolítica =  $2e(10*(DO-0,72))$  deduzida de numerosas determinações da absorvância da actividade hemolítica, usando diluições aritméticas de soluções activas. O mínimo de actividade hemolítica detectável por este método é 0,005 UAH. Na fórmula DO é o valor da densidade óptica da amostra a quantificar.

### 2.3.2. Detecção de actividades citolíticas, citotóxicas, hemolíticas e enzimáticas nos filtrados dos sobrenadantes dos meios de cultura de *X. nematophila*

Os filtrados dos sobrenadantes dos meios de cultura de *X. nematophila* apresentam todas as actividades citolíticas/citotóxicas, hemolíticas e enzimáticas pesquisadas nos estudos em que se utilizaram os nemátodos. O aparecimento destas actividades ocorre em todos os meios de cultura utilizados e obedece a uma cinética que depende do tempo de incubação. As Tabelas XIV a XVI sumarizam os resultados obtidos na determinação da cinética das actividades citolítica/citotóxica, hemolítica e proteásica. Estes dados representam, também, o esforço de investigação na optimização e escolha do meio mais adequado para a produção dos factores hemolíticos/citotóxicos.

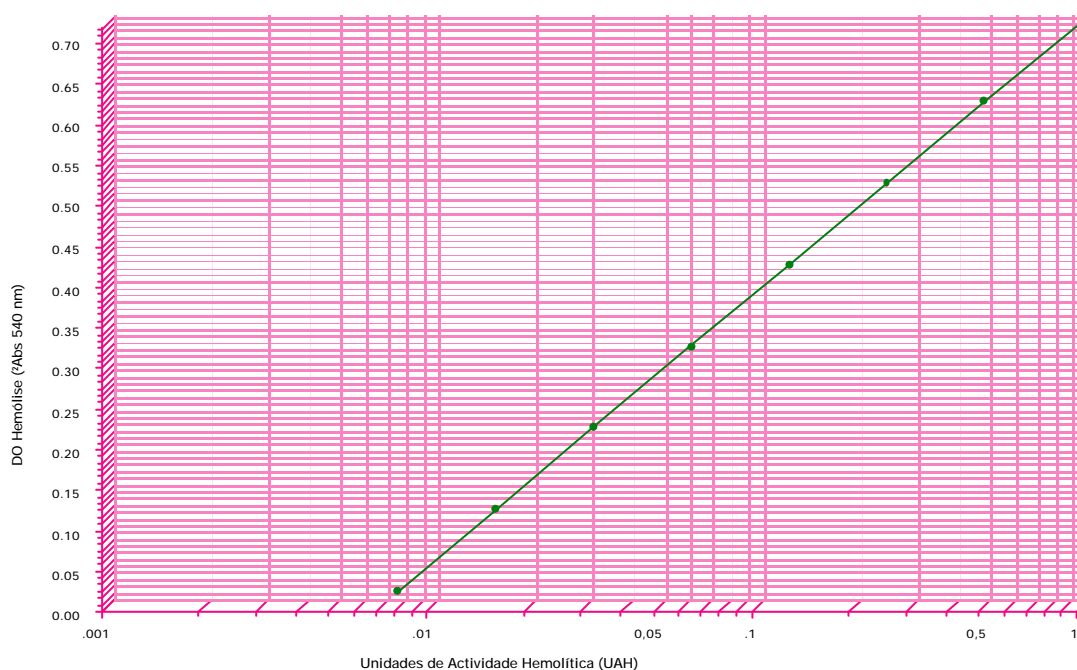


Fig. 17 - Actividade hemolítica em função das diluições de amostras positivas. A recta de calibração Abs<sub>540</sub> do título da actividade hemolítica em representação semi-logarítmica. O mínimo de actividade hemolítica detectável é 0,005 UAH. DO é o valor da densidade óptica da amostra a quantificar.

A análise dos resultados expressos na Tabela XIV torna evidente que é a bactéria *X. nematophila*, simbiote de *S. carpocapsae*, a responsável pela produção do factor com actividade citolítica/citotóxica. Além disto, a cinética de

produção da citotoxina é muito semelhante à representada na Tabela VI para o complexo simbiote. Com efeito, em qualquer dos sobrenadantes dos três meios de cultura utilizados, respectivamente, NMTH, NTSB e XnMTH, as cinéticas de produção da citotoxina e da protease são sobreponíveis. Além disto, em XnMTH a cinética de produção da actividade citolítica/citotóxica revelou-se inteiramente sobreponível com a actividade hemolítica contra hemácias de carneiro. A constatação de que a bactéria simbiote é a responsável pela produção *in vitro* da citolisina/citotoxina, permitiu reorientar a direcção do trabalho e reduzir a manipulação do complexo simbiote a um só parceiro. Doravante, os ensaios de cinética de produção da citotoxina passaram a ser executados com o parceiro bacteriano da simbiose e o esforço concentrou-se na pesquisa do meio mais adequado para obter a melhor produção e, conseqüentemente, conseguir a separação e purificação bioquímica deste factor.

A Tabela XV resume os resultados da cinética dos factores citolíticos/citotóxicos, hemolíticos e proteásicos nos sobrenadantes de XnTSB. Constata-se, de imediato, que em meio TSB o aparecimento da citotoxina/hemolisina é precoce em relação ao observado anteriormente. De facto, às 12 h se detecta uma ligeira actividade citotóxica, às 15 h o sobrenadante de cultura apresenta uma actividade já importante, na ordem de  $\pm 30\%$  atingindo 100% às 21 h de incubação. A partir das 27 até às 36 h esta actividade parece diminuir de intensidade voltando a aumentar ligeiramente sem nunca mais atingir o nível de 100% de mortalidade total de hemócitos. No que concerne à actividade hemolítica, contudo, o estudo da cinética da sua produção revela que na primeira etapa a actividade hemolítica contra hemácias de carneiro está presente e acompanha a citotóxica mas que, a partir das 27 h, sofre um declínio constante até desaparecer completamente do sobrenadante.

Quanto à actividade proteásica observa-se uma flutuação que acompanha a da curva da actividade citotóxica. Contudo, os seus níveis não são tão elevados como os obtidos nas incubações do complexo simbiote, (Tabela VI).

Finalmente a Tabela XVI, apresenta os resultados obtidos no estudo da cinética de produção dos factores citotóxicos, hemolíticos e proteásicos de *X. nematophila* nos sobrenadantes dos meios de cultura TSB e LB. A

quantificação dos resultados é feita hora a hora a partir das 15 h de incubação e existe um novo elemento de análise que é a densidade óptica da cultura bacteriana ao longo do tempo. Constatou-se que a cinética de produção da citolisina/citotoxina extracelular é dependente da fase de crescimento bacteriano e bastante estável e reprodutível em meio TSB.

Observou-se que a produção dos factores citolíticos/citotóxicos se inicia na fase final do crescimento exponencial, atingindo o seu máximo já na fase de abrandamento do crescimento bacteriano ou fase estacionária, com densidades ópticas de 2,6-2,8 obtidas, respectivamente, entre as 21 e 22 h de incubação. A estes resultados acresce a constatação de que ao máximo de actividade citotóxica e hemolítica correspondeu um mínimo de actividade proteásica.

A análise dos resultados expressos nas três tabelas revelou, também, que a produção dos factores de citotoxicidade foi dependente dos meios de cultura utilizados. Facilmente se constatou que, a cinética de produção temporal e a sensibilidade celular específica, eram diferentes quando se compararam as culturas em MTH, TSB e LB. Acresce a estes factos que, em meio LB, a estabilidade e os níveis de citotoxicidade não foram sempre tão elevados e o modo da sua produção não foi tão fiável e reprodutível como nos outros dois meios.

**Tabela XIV**

Cinética de produção dos factores citolíticos/citotóxicos e proteásicos, nos sobrenadantes dos meios de cultura XnMTH, em função do tempo de incubação de *X. nematophila*

<b>XnMTH</b>		
<b>Tempo<sup>1</sup> (horas)</b>	<b>% de Mortalidade total de hemócitos<sup>2</sup></b>	<b>Actividade Proteásica<sup>3</sup> (Ueq)</b>
<b>0-12</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>15</b>	<b>0</b>	<b>100±5,0</b>
<b>18</b>	<b>0</b>	<b>180±10,0</b>
<b>21</b>	<b>0</b>	<b>230±17,5</b>
<b>24</b>	<b>0</b>	<b>320±5,0</b>
<b>27</b>	<b>7,8±3,0<sup>a</sup> / 10,5±2,5<sup>b</sup></b>	<b>450±7,5</b>
<b>30</b>	<b>19,6±1,8 / 21,5±2,7</b>	<b>650±25,0</b>
<b>33</b>	<b>56,4±6,8 / 57,9±5,1</b>	<b>650±27,5</b>
<b>36</b>	<b>60,3±6,0 / 63,0±3,4</b>	<b>650±50,0</b>
<b>39</b>	<b>76,3±5,0 / 75,2±7,0</b>	<b>1500±50</b>
<b>42</b>	<b>82,0±3,1 / 80,1±5,5</b>	<b>2550±150</b>
<b>45<sup>4</sup></b>	<b>90,0±8,3 / 92,4±4,4</b>	<b>5275±150</b>
<b>48<sup>4</sup></b>	<b>100</b>	<b>5350±100</b>
<b>51<sup>4</sup></b>	<b>100</b>	<b>3750±75</b>
<b>60<sup>4</sup></b>	<b>100</b>	<b>1250±100</b>
<b>70<sup>4</sup></b>	<b>100</b>	<b>950±50</b>

<sup>1</sup> Tempo de incubação da cultura de *X. nematophila* em MTH

<sup>2</sup> Citotoxicidade expressa em percentagem de mortalidade total de hemócitos de a) *G. mellonella* e b) *M. unipuncta*, (Média±desvio padrão; n=6)

<sup>3</sup> Unidades equivalentes (Ueq) da actividade proteásica da tripsina. Uma solução de tripsina a 1 mg/mL possui 10000 U unidades de actividade proteásica (unidade definida para a tripsina pela Comissão Enzimática EC3.4.21.4), (Média±desvio padrão; n=6)

<sup>4</sup> Sobrenadantes com 1,0 unidades de actividade hemolítica (UAH) contra hemácias de carneiro

**Tabela XV**

Cinética de produção dos factores citolíticos/citotóxicos, hemolíticos e proteásicos, nos sobrenadantes dos meios de cultura XnTSB, em função do tempo de incubação de *X. nematophila*

<b>XnTSB</b>			
<b>Tempo<sup>1</sup> (horas)</b>	<b>% de Mortalidade total de hemócitos<sup>2</sup></b>	<b>Hemólise<sup>3</sup> (UAH)</b>	<b>Actividade Proteásica<sup>4</sup> (Ueq)</b>
<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>950±25,0</b>
<b>12</b>	<b>&lt;10</b>	<b>0,02</b>	<b>1585±10,0</b>
<b>15</b>	<b>29,5±8,5</b>	<b>0,57</b>	<b>825±25,0</b>
<b>18</b>	<b>98,5±1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>175±25,0</b>
<b>21</b>	<b>100</b>	<b>4,0</b>	<b>&lt;100</b>
<b>24</b>	<b>100</b>	<b>3,0</b>	<b>&lt;100</b>
<b>27</b>	<b>96,1±3,0</b>	<b>1,0</b>	<b>150±7,5</b>
<b>30</b>	<b>40,2±6,8</b>	<b>0,48</b>	<b>450±50,0</b>
<b>33</b>	<b>38,0±4,5</b>	<b>0,1</b>	<b>1250±50</b>
<b>36</b>	<b>47,2±1,5</b>	<b>0,05</b>	<b>1250±150</b>
<b>39</b>	<b>63,5±4,0</b>	<b>0,05</b>	<b>1000±50</b>
<b>42</b>	<b>78,4±6,2</b>	<b>0,03</b>	<b>525±50</b>
<b>45</b>	<b>80,0±3,3</b>	<b>0,015</b>	<b>500±50</b>
<b>48</b>	<b>80,2±3,4</b>	<b>0,01</b>	<b>&lt;100</b>
<b>51</b>	<b>75,5±5,0</b>	<b>0</b>	<b>&lt;100</b>

<sup>1</sup> Tempo de incubação da cultura de *X. nematophila* em TSB

<sup>2</sup> Citotoxicidade expressa em percentagem de mortalidade total de hemócitos de *G. mellonella* (Média±desvio padrão; n=4)

<sup>3</sup> Unidades de actividade hemolítica (UAH) contra hemácias de carneiro. (Média±desvio padrão; n=4)

<sup>4</sup> Unidades equivalentes de actividade proteásica da tripsina (Ueq). Uma solução de tripsina a 1 mg/mL possui 10000 U unidades de actividade proteásica (unidade definida para a tripsina pela Comissão Enzimática EC3.4.21.4). (Média±desvio padrão; n=4)

**Tabela XVI**

Cinética de produção dos factores citotóxicos e proteásicos, nos sobrenadantes dos meios de cultura XnTSB e XnLB, em função do tempo de incubação e da densidade óptica do crescimento populacional de *X. nematophila*

Tempo (horas)	XnTSB			XnLB	
	D.O 540 nm <sup>1</sup>	% Mortalidade <sup>2</sup> Hemólise (UAH) <sup>3</sup>	Actividade Proteásica <sup>4</sup> (Ueq)	% Mortalidade <sup>2</sup> Hemólise (UAH) <sup>3</sup>	Actividade Proteásica <sup>4</sup> (Ueq)
3h	0,03	0 / 0	0	0 / 0	0
6h	0,09	0 / 0	875±25	0 / 0	1180±75
12h	0,5	0 / 0	1375±50	37,0±17,5 / 0,15	1500±150
15h	0,9	24,5±3,5 / 0,1	975±25	63,0±24,1 / 0,63	1100±75
16h	1,2	52,5±5,0 / 0,68	150±7,5	82,5±15,0 / 0,87	900±50
17h	1,4	80,4±6,7 / 0,9	125±25	90,5±6,3 / 0,91	400±25
18h	2,0	95,0±4,5 / 1,0	125±10	94,0±4,2 / 0,95	275±10
19h	2,2	100 / 2,0	125±10	96±3,8 / 1,0	150±10
20h	2,4	100 / 3,0	<100	100 / 2,0	100±10
21h	2,6	100 / 4,0	<100	100 / 4,0	75±10
22h	2,8	100 / 4,0	<100	100 / 3,0	<50
23h	3,0	100 / 3,0	<100	100 / 2,0	<50
24h	2,8	100 / 3,0	<100	100 / 1,0	<50

<sup>1</sup> Densidade óptica da cultura bacteriana em TSB e LB ao longo do tempo de incubação (horas)

<sup>2</sup> Citotoxicidade expressa em percentagem de mortalidade total de hemócitos de *S. littoralis* (Média±desvio padrão; n=6)

<sup>3</sup> Hemólise de hemácias de carneiro expressa em unidades de actividade hemolítica (UAH), (Média±desvio padrão; n=6)

<sup>4</sup> Unidades equivalentes de actividade proteásica da tripsina (Ueq). Uma solução de tripsina a 1 mg/mL possui 10000 unidades (U) de actividade proteásica (unidade definida para a tripsina pela Comissão Enzimática EC3.4.21.4); (Média±desvio padrão; n=6)

### 2.3.3. Extracção e doseamento de LPS de *X. nematophila*. Detecção da actividade citolítica/citotóxica sobre hemócitos e hemolítica sobre hemácias de carneiro

A partir do protocolo de extracção de LPS utilizado, e, com base no doseamento efectuado, estimou-se que uma solução, de 2 mg/mL de LPS de *X. nematophila* correspondeu, aproximadamente, a  $12,5 \times 10^4$  unidades de endotoxina. As soluções destes LPS de *X. nematophila* (40.000 U) em meio TSB

ou tamponadas em PBS, mostraram não possuir quaisquer efeitos citotóxicos contra hemócitos de insectos e/ou sobre hemácias de carneiro.

De igual modo as soluções dos LPS comerciais de *E. coli* e *S. marcescens* utilizadas (Material e Métodos; 5.7) mostraram, também, não possuir qualquer tipo de actividade biológica tanto contra hemócitos como hemácias de carneiro.

### **2.3.4. Caracterização dos factores citolíticos e citotóxicos**

#### **2.3.4.1. Especificidade Celular**

A análise dos resultados, constantes nas Tabelas XVII e XVIII, revelou que existiam diferentes cinéticas de produção dos factores citolíticos/citotóxicos e hemolíticos em função das células alvo. À medida que o tempo de incubação e o crescimento da cultura bacteriana aumentavam os filtrados dos sobrenadantes apresentavam dois picos com uma apreciável actividade citolítica/citotóxica contra hemócitos de insectos e manifestavam duas actividades hemolíticas contra hemácias alvo diferentes. Estas actividades foram denominadas por C1 e C2 respectivamente.

A primeira actividade hemolítica tinha como células alvo as hemácias de carneiro e surgiu concomitantemente com a actividade citolítica/citotóxica contra hemócitos de insectos (C1). Estes factores extracelulares foram lançados para o meio TSB de cultura entre a fase de abrandamento exponencial e a entrada na fase estacionária do crescimento bacteriano, (Tabela XVII).

A actividade biológica máxima destes factores ocorreu entre as 20-25 h pós-incubação ao que correspondeu a DO de 2,5-2,8. As actividades biológicas decresceram, tendo sido observado que a hemolítica sofreu uma diminuição rápida até que desapareceu pura e simplesmente dos sobrenadantes por volta das 50 h e DO igual a 7,5. Por seu lado, a actividade citolítica/citotóxica teve uma redução bastante acentuada a partir de 30 h de incubação e DO igual a 5,0. A partir deste momento notou-se um novo aumento de actividade citolítica/citotóxica que foi acompanhada de uma nova actividade hemolítica

positiva mas, desta feita, contra hemácias de coelho (C2). Os resultados da recta de calibração da actividade hemolítica, da responsabilidade do factor C2, é diferente dos que foram obtidos para o factor C1 porque a hemólise das hemácias de coelho é directamente proporcional em função da diluição das amostras activas.

### Tabela XVII

Cinética comparativa em meio XnTSB da produção extracelular dos factores citotóxicos/citolíticos contra hemócitos de *S. littoralis* e de factores hemolíticos contra hemácias de carneiro e de coelho

<b>Tempo (horas)<sup>1</sup></b>	<b>DO (540 nm)<sup>2</sup></b>	<b>Hemólise de Hemácias de Carneiro (UAH Média)<sup>3</sup></b>	<b>Hemólise de Hemácias de Coelho (UAH Média)<sup>4</sup></b>	<b>% Média de Mortalidade Total de Hemócitos<sup>5</sup></b>
<b>0</b>	<b>0,01</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>5</b>	<b>0,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10</b>	<b>0,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>35</b>
<b>15</b>	<b>1,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0</b>	<b>70</b>
<b>20</b>	<b>2,5</b>	<b>3,0</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
<b>25</b>	<b>2,8</b>	<b>3,0</b>	<b>0,15</b>	<b>100</b>
<b>30</b>	<b>5,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,25</b>	<b>40</b>
<b>35</b>	<b>6,0</b>	<b>0,8</b>	<b>0,38</b>	<b>50</b>
<b>40</b>	<b>7,0</b>	<b>0,6</b>	<b>0,47</b>	<b>65</b>
<b>45</b>	<b>7,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>80</b>
<b>50</b>	<b>7,5</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>80</b>
<b>60</b>	<b>7,5</b>	<b>0</b>	<b>0,6</b>	<b>80</b>
<b>70</b>	<b>7,5</b>	<b>0</b>	<b>0,65</b>	<b>75</b>

1 e 2 Densidade óptica da cultura bacteriana em TSB ao longo do tempo de incubação (n=3)

3 e 4 Hemólise de hemácias de carneiro e de coelho expressa em média de unidades de actividade hemolítica (n=3)

5 Citotoxicidade expressa em percentagem média de mortalidade de hemócitos de *S. littoralis* (n=3)

A Tabela XVIII evidencia o resultado dos ensaios hemolíticos em que se usaram diferentes tipos de hemácias e em que se testaram diluições seriadas dos

sobrenadantes de cultura XnTSB após incubação da bactéria às 21-24 h e 48-51 h. No primeiro intervalo de tempo a actividade hemolítica conduziu à lise total das hemácias de porco, vaca, cabra e carneiro e revelou-se negativa quando em presença de hemácias humanas e de coelho. De notar que, a diluição dos sobrenadantes permitiu constatar a diferença de sensibilidade das hemácias utilizadas ao factor hemolítico. Com efeito, as hemácias de porco foram as mais sensíveis obtendo-se lise total com o sobrenadante diluído cinco vezes. Por seu lado, no segundo intervalo de tempo, constatou-se que a actividade hemolítica contra hemácias de carneiro desapareceu, enquanto que, contra hemácias de coelho a hemólise foi da ordem de 0,8-1,0 UAH.

### Tabela XVIII

Actividade hemolítica, do sobrenadante da cultura XnTSB, sobre vários tipos de hemácias

Tempo (horas) <sup>1</sup>	Hemólise (UHA) <sup>2</sup>					
	Hemácias					
	Homem <sup>3</sup>	Coelho	Porco	Vaca	Cabra	Carneiro
<b>21-24</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5,0</b>	<b>4,0</b>	<b>3,0</b>	<b>3,0</b>
<b>48-51</b>	<b>n.t.<sup>4</sup></b>	<b>0,8-1,0</b>	<b>n.t.<sup>4</sup></b>	<b>n.t.<sup>4</sup></b>	<b>n.t.<sup>4</sup></b>	<b>0,01-0</b>

1 Tempo de incubação de *X. nematophila* no meio de cultura TSB, (sobrenadante XnTSB)

2 Unidades de actividade hemolítica (=diluição que ainda possui hemólise total)

3 Testados todos os grupos sanguíneos humanos

4 Não testado

A Fig. 18 mostra o gráfico da produção dos factores C1 e C2 em função do tempo de cultura bacteriana meio LB. Nota-se que a cinética é bastante semelhante à da representada na Tabela VII para o meio TSB. Apesar das evidentes semelhanças observa-se que as actividades C1 e C2 contra hemócitos de insectos são um pouco mais fracas e as hemolíticas também. Quanto aos hemócitos notou-se, também, uma evidente especificidade celular que se

manifestou na citotoxicidade diferencial entre os diversos tipos celulares. Os filtrados dos sobrenadantes positivos contra hemácias de carneiro (C1) mostraram serem mais activos contra os granulócitos do que contra os plasmatócitos tendo sido as células esféricas as mais resistentes.

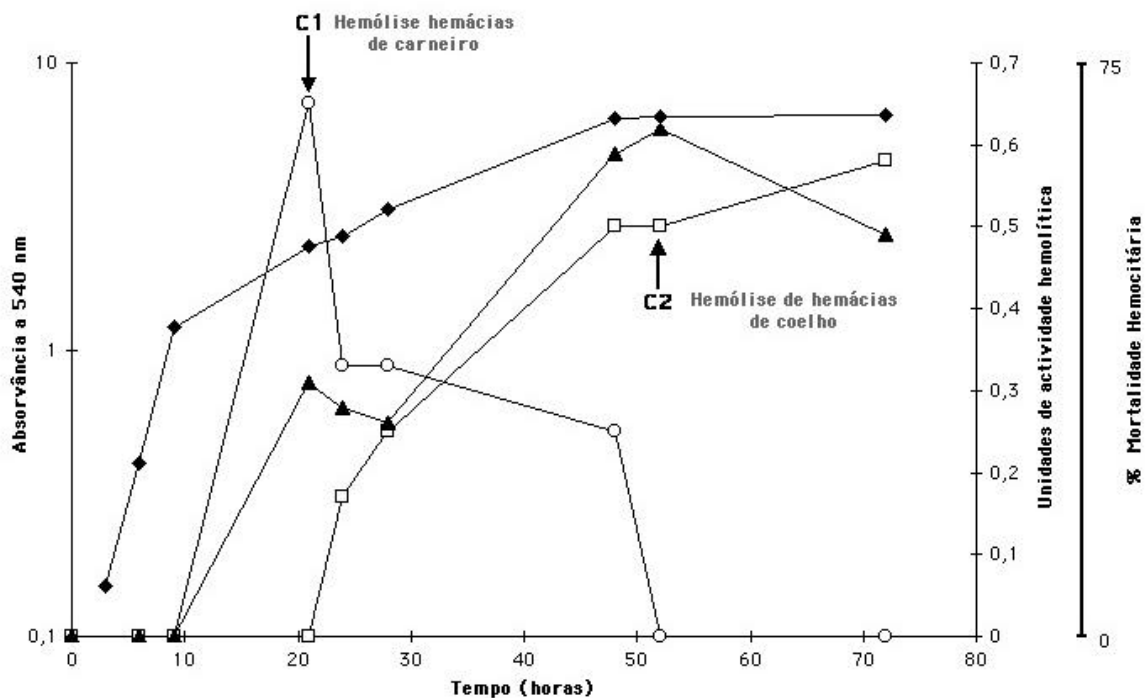


Fig. - 18. Relação entre a actividade citolítica extracelular e o crescimento em meio LB de cultura líquido de *X. nematophila* F1/1. A hemólise/citólise de hemácias foi expressa em unidades de hemólise pela quantificação da libertação de hemoglobina a OD=540 nm. A citólise dos hemócitos de insectos foi expressa com percentagem de hemócitos mortos relativamente à contagem total de hemócitos existentes usando o ensaio da exclusão do azul Trypan. Os extractos extracelulares citolíticos seleccionados para demais caracterização estão indicados no topo do gráfico e foram designados como C1 e C2 de *X. nematophila* F1/1. **Losango negro:** Crescimento bacteriano medido a OD=540 nm; **Círculo branco:** Hemólise de eritrócitos de carneiro; **Triângulo negro:** Actividade citolítica sobre hemócitos de *S. littoralis*; **Quadrado branco:** Hemólise de eritrócitos de coelho.

Os sobrenadantes C1 diluídos duas vezes mostraram citotoxicidade contra hemócitos de *S. littoralis* porque cerca de 90% dos granulócitos e 60% dos plasmatócitos estavam corados pelo azul Trypan após 1 h de incubação enquanto que as células esféricas estavam vivas, (Fig. 19B). Estes resultados fizeram lembrar os obtidos com as fracções cromatográficas e os sobrenadantes dos meios de cultura do complexo simbiote (NMTB e NTSB). Por seu lado, os efeitos dos

filtrados dos sobrenadantes positivos contra hemácias de coelho (C2), foram bastante diferentes dos anteriores quanto aos efeitos sobre os hemócitos. De facto, os plasmatócitos foram as células mais sensíveis tendo sido difícil reconhecê-los e distingui-los dos granulócitos, porque tinham perdido as suas lamelas citoplásmicas, aparecendo como células arredondadas e densamente plasmolisadas (Fig. 19C). Acresce que as células esféricas se revelaram, também, muito sensíveis ao C2 (Fig. 19C).

Os efeitos mais relevantes sobre os hemócitos, acessíveis à observação em microscopia óptica são, respectivamente, a intensa vacuolização dos granulócitos seguida de lise celular provocado pelo sobrenadante C1 e, por seu lado, a densificação dos plasmatócitos da responsabilidade dos sobrenadantes C2 (Fig. 19 C e E). Estes resultados evidenciaram claramente que ambos os factores citolíticos/citotóxicos e hemolíticos eram distintos um do outro, possuindo cinéticas dependentes da fase de crescimento populacional e que os mecanismos da sua produção foram independentemente regulados.

De notar que existe uma diferença substancial entre a actividade citolítica contra hemócitos de insectos quando o crescimento bacteriano se processa nos meios LB ou TSB. Esta diferença está bem documentada nos resultados expressos na Tabela XVII e os do Gráfico da Fig. 18, designadamente, no que respeita à actividade C1.

#### **2.3.4.2. Resistência aos factores físicos e químicos**

Os filtrados dos sobrenadantes C1 e C2 mostraram estabilidade à congelação a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  e em azoto líquido porque foi demonstrado que, após a congelação, se recuperaram os mesmos níveis de actividade citolítica/hemolítica. No entanto, o sobrenadante C1 perdeu as actividades hemolíticas contra hemácias de carneiro e citolítica/citotóxica contra hemócitos após armazenamento, por períodos de duas a três semanas, à temperatura ambiente, ou após tratamento com protease (tripsina) ou choque térmico de 1 h a  $55^{\circ}\text{C}$  ou a  $60^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, com perda parcial e total das actividades. Por seu lado, o C2 mostrou estabilidade sem perda de actividades após tais tratamentos. Curiosos e surpreendentes foram os resultados que mostraram que i) a actividade

hemolítica contra hemácias de coelho foi aumentada, após tratamento pelo calor, sugerindo a inactivação de um inibidor ii) enquanto que, a actividade citolítica/citotóxica contra hemócitos sofreu um efeito negativo tendo os seus níveis de mortalidade diminuído.

A cinética de produção das actividades biológicas do C1 e C2 mostraram não serem dependentes da presença ou ausência de cálcio nos meios de cultura. Com efeito, os meios de cultura, em presença de cálcio ou após a sua depleção pelo EGTA, originaram os filtrados sobrenadantes C1 e C2 os quais apresentaram a mesma especificidade celular e os mesmos níveis de actividade. Estes resultados parecem indicar que as moléculas responsáveis pelos efeitos biológicos são produzidas independentemente da presença de cálcio e que este elemento também não é necessário para a sua actividade.

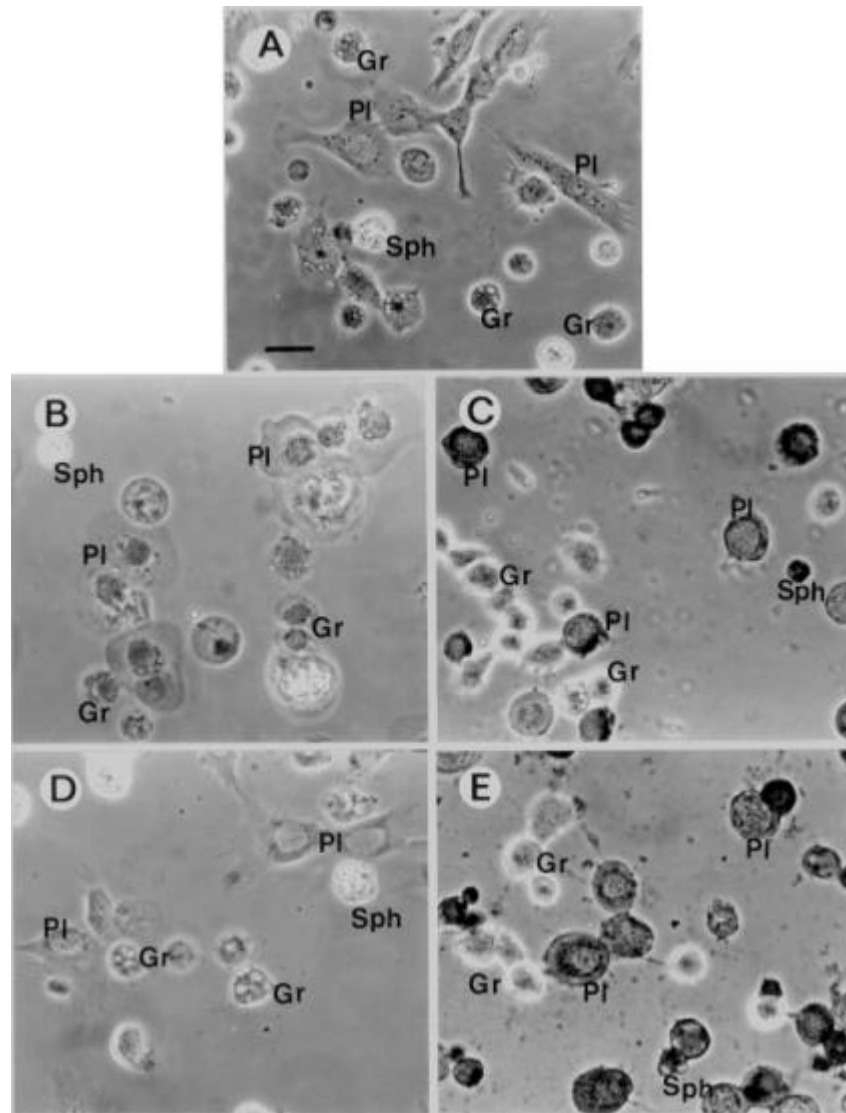


Fig. 19 – Aspecto dos hemócitos de *S. littoralis*, observados em microscopia óptica de contraste de fase após 1h de incubação a 22°C com diferentes extractos. Barra=10 µm. Todos os extractos incubados com os hemócitos foram diluídos 1/1 em PBS (v/v). (A) Hemócitos testemunha incubados em meio estéril isento de crescimento bacteriano; (B) Hemócitos incubados com o extracto apresentando a actividade tipo C1, proveniente do meio de cultura onde cresceu *X. nematophila* F1/1. De notar que todos os hemócitos, excepto as células esféricas, se encontram túrgidos e com o núcleo corado pelo azul Trypan; (C) Hemócitos incubados com o extracto apresentando a actividade do tipo C2 proveniente do meio onde cresceu a mesma estirpe bacteriana. A maior parte dos plasmatócitos são células mortas, porque estão corados com o azul Trypan. De notar que estas células estão plasmolisadas com o citoplasma denso e compacto e sem os lamelipodia característicos. Os granulócitos estão refringentes e aparentemente vivos; (D) Hemócitos incubados com o meio de cultura onde cresceu o mutante do operão *flhD* negativo. De notar que, nas mesmas condições de cultura, os extractos não apresentam a actividade do tipo C1. Os hemócitos assemelham-se aos testemunha; (E) Hemócitos incubados com o meio de cultura onde cresceu o mutante do operão *flhD* negativo. De notar que, nas mesmas condições de cultura, os extractos não apresentam a actividade do tipo C2. Os hemócitos apresentam as mesmas características da foto em (C).

## 2.4. Conclusão

O essencial das actividades encontradas no meio de incubação do complexo nematobacteriano foi encontrado nos meios de cultura da bactéria. Por seu lado, o meio de incubação do nemátodo axénico só apresenta uma actividade proteásica muito fraca e, apenas, quando em presença de uma mistura de vários estados larvares. Portanto, é evidente que é a bactéria *X. nematophila* que está na origem das diferentes actividades, as quais constituem os potenciais factores de virulência, evidenciados inicialmente no complexo simbiote.

De entre esses potenciais factores de virulência, duas actividades citotóxicas, C1 e C2, foram produzidas pela bactéria. Estas actividades têm por alvo os hemócitos de insectos mas possuem especificidades e efeitos citotóxicos diferentes. Cada uma delas apresenta, igualmente, uma actividade hemolítica contra hemácias de origem distinta.

Os trabalhos desenvolvidos por uma outra equipa do Laboratório EMIP mostraram que a actividade C1 parece ser um factor capital de virulência na colonização do meio insecto pela bactéria. Por conseguinte, iniciou-se o estudo aprofundado desta actividade citotóxica tendo como primeiro objectivo a purificação do(s) factor(es) molecular(es) envolvido(s).