

# **Introdução Geral**

O complexo simbiote nematobacteriano formado pelo nemátodo *Steinernema carpocapsae* e a enterobactéria *Xenorhabdus nematophila* é fortemente patogénico para um grande número de espécies de insectos (Laumond *et al.*, 1979). Esta facultade tem sido utilizada desde há muitos anos em Luta Biológica Integrada contra os insectos pragas e este complexo simbiote tornou-se, logo a seguir à bactéria *Bacillus thuringiensis*, um dos meios de luta biológica mais utilizados. Contudo, inversamente do que se passa com o *B. thuringiensis*, do qual algumas toxinas foram clonadas sendo vulgarmente utilizadas em formulações químicas isentas da bactéria, até ao momento só o complexo nemátodo-bactéria possui uma eficácia entomotóxica e/ou entomopatogénica. Actualmente, as eventuais toxinas produzidas por este complexo são totalmente desconhecidas se bem que certas proteínas activas contra os insectos tenham sido muito recentemente purificadas a partir de um complexo nematobacteriano vizinho, *Heterorhabditis bacteriophora* - *Photorhabdus luminescens* (Bowen *et al.*, 1998).

É evidente que a forte capacidade insecticida que o complexo *Steinernema-Xenorhabdus* apresenta é devida a factores de virulência secretados e activos sobre diferentes alvos presentes nos insectos. Um desses alvos é constituído pelo sistema imunitário. Com efeito, para que o nemátodo e a bactéria possam instalar-se e proliferar, é necessário que evitem, contornando ou deprimindo, as diversas e muito eficazes reacções de defesa que os insectos podem desencadear. Considera-se que a imunidade nos insectos está baseada em dois tipos de reacções:

\* Reacções de imunidade humoral para as quais os activadores são moléculas solúveis no plasma. Este é o caso dos múltiplos péptidos antibacterianos presentes num grande número de espécies de insectos (Hoffmann *et al.*, 1999).

\* Por outro turno, existem igualmente as reacções de imunidade celular nas quais os activadores são as células inteiras. Este é o caso, por exemplo, dos macrófagos que realizam a fagocitose (Brehélin, 1990).

Em geral, as reacções de imunidade humoral são induzidas, o que quer dizer que no seguimento de um sinal dado pelo corpo invasor, os genes vão ser

activados, os quais vão desencadear os mecanismos de transcrição e tradução que conduzirão à síntese de péptidos antibacterianos e antifúngicos. Existe, portanto, um tempo de latência (em geral várias horas) entre a penetração do corpo estranho e o desencadear do meio de resposta e de luta contra o invasor. Ao contrário as reacções celulares são imediatamente eficazes. As células que as realizam, podem ser mobilizadas a partir da penetração do corpo estranho na hemolinfa e preencher as suas funções a partir do primeiro contacto com o agente patogénico potencial. Reconhecem-se classicamente dois grandes tipos de reacções de defesa celular nos insectos. Os dois são realizados por células livres da hemolinfa, os hemócitos.

\* Em primeiro lugar, trata-se da formação de uma cápsula. Esta reacção original é universalmente conhecida no conjunto do ramo dos artrópodes. A partícula de grandes dimensões que não pode ser fagocitada por uma única célula, é isolada do resto do organismo do insecto por intermédio de várias camadas concêntricas formadas por numerosos hemócitos que se dispõem à superfície do corpo estranho em camadas sobrepostas uns sobre os outros. Estes hemócitos são os Plasmatócitos. Esta reacção, potencialmente, poderá desenvolver-se à superfície do nemátodo desde a sua penetração na hemolinfa.

\* Trata-se por outro lado da fagocitose, reacção conhecida no vasto conjunto do Reino Animal. Nos insectos, a fagocitose que se desenvolve como reacção de defesa, é realizada por diferentes tipos de hemócitos, sendo de longe os mais eficazes os Granulócitos. As bactérias do complexo nematobacteriano poderiam ser eliminadas por fagocitose.

Para compreender como é que o complexo nematobacteriano se instala e prolifera na hemolinfa, é necessário conhecer como é que contorna ou evita o encapsulamento e a fagocitose. No presente trabalho tentaremos fornecer elementos para a compreensão deste fenómeno de escapamento às reacções de defesa. O nosso objectivo foi o de evidenciar os factores produzidos, pelo menos, por um dos elementos do complexo, que poderia perturbar o funcionamento dos hemócitos.

Após uma actualização bibliográfica que faz o objecto da primeira parte e após a descrição dos meios técnicos e métodos na segunda parte, os resultados do

nosso trabalho de investigação são expostos na terceira parte subdividida em quatro grandes capítulos.

1.- No primeiro destes capítulos fazemos um estudo dos hemócitos das espécies de lepidópteros que foram escolhidos para este estudo *Mythimna unipuncta* e *Spodoptera littoralis* ambos pertencentes à família Noctuidae. As grandes funções desempenhadas por cada um dos tipos celulares são descritas assim como o comportamento dos hemócitos *in vitro*. Isto permitir-nos-á descrever o estabelecimento e a afinação de um teste original de utilização dos hemócitos para o estudo das relações bactérias-insectos, que será utilizado no resto do nosso trabalho. Os resultados deste capítulo estão, em parte, reportados na nossa publicação n°1.

2.- O segundo capítulo é consagrado à evidenciação e descrição detalhada das actividades citotóxicas desenvolvidas pelo complexo nematobacteriano, principalmente, pela bactéria. São caracterizados cada um dos diferentes factores responsáveis pelas actividades citotóxicas. Este capítulo permitir-nos-á escolher, de entre todos os factores encontrados, aquele que nos pareceu o mais importante participante na depressão das reacções imunitárias induzidas pela bactéria. Será sobre o factor escolhido que incidirão os estudos desenvolvidos nos capítulos seguintes. Os resultados expostos neste quarto capítulo são os reportados nas nossas publicações n° 2 e 3.

3.- O terceiro capítulo é consagrado à purificação e à descrição bioquímica do principal factor que nós chamámos  $\alpha$ -Xenorhabdolisina. Foram efectuados numerosos ensaios para esta purificação mas descreveremos essencialmente o método que nos permitiu obter uma fracção pura. Mostraremos que esta citotoxina é uma molécula do grupo muito importante das toxinas de origem bacteriana, que era totalmente desconhecida antes do nosso estudo. É a partir desta fracção totalmente purificada que podemos efectuar a continuação do nosso trabalho de investigação.

4.- No quarto capítulo descreveremos os efeitos deste factor citotóxico sobre as células alvo que são os hemócitos. Este estudo foi feito em microscopia óptica e electrónica. Permitiu-nos mostrar que em função das condições de aplicação, a  $\alpha$ -Xenorhabdolisina poderia induzir quer a necrose quer a apoptose dos

hemócitos. O impacto desta citotoxina sobre a permeabilidade da membrana plasmática dos macrófagos de insectos também foi estudada por intermédio de técnicas de “patch-clamp” ou contacto hermético para medição das alterações do comportamento electrofisiológico das células. A presença de um receptor membranar deste factor será discutido.

Na última parte substantiva do nosso trabalho está consagrado à discussão geral e conclusões, na qual faremos o estudo crítico dos resultados obtidos. Mostraremos que o factor citotóxico que purificámos e estudámos pode participar na depressão das reacções de imunidade celulares desenvolvidas pelo insecto. Discutiremos, em particular, a importância desta citotoxina no conjunto dos factores produzidos pela bactéria *X. nematophila* para colonizar o meio insecto.

A finalizar apresentaremos a lista de referências bibliográficas consultadas no decurso do trabalho.

## **1ª Parte**

### **Estudo bibliográfico**

## 1. O complexo nematobacteriano

*Xenorhabdus* é um género de bactérias que acomodam organismos caracterizados por serem bacilos móveis, de grandes dimensões (5-10 µm de comprimento), Gram negativos, heteroquimiorganotróficos, catalase e oxidase negativos, anaeróbios facultativos com metabolismo respiratório e fraco metabolismo fermentativo, (Thomas e Poinar, 1979; Bergey's Manual, 1984, 1993; Boemare e Akhurst, 1988; Boemare *et al.*, 1993; Boemare *et al.*, 1996; Forst e Neelson, 1996; Forst *et al.*, 1997; Boemare e Akhurst, 2001).

Os resultados taxonómicos actualmente disponíveis colocam aquele género na subclasse das  $\gamma$ -*Proteobacteria* que inclui a família Enterobacteriaceae. Esta subclasse, (Bergey's Manual, 2000; [<http://www.cme.msu.edu/Bergeys/btcomments/bt9pdf>; <http://www.cme.msu.edu/Bergeys/taxonomy.info.html>]), além da família *Enterobacteriaceae*, que reagrupa um conjunto muito relevante de bactérias com interesse médico e veterinário, também alberga seis outras famílias de bactérias conhecidas por serem agentes patogénicos de animais e humanos, tais como, *Aeromonadaceae*, *Legionellaceae*, *Pasteurellaceae*, *Vibrionaceae* e *Pseudomonaceae* (Stackebrandt, 1999).

As espécies bacterianas pertencentes ao género *Xenorhabdus* são simbiontes específicos de uma família de nemátodos entomopatogénicos, Steinernematidae. O par simbiote nemátodo-bactéria é patogénico, capaz de parasitar e matar os estados larvares de insectos, (Akhurst e Boemare, 1990). Os resultados de vários estudos mostram que os dois parceiros da simbiose, quando utilizados em separado, podem também ser individualmente patogénicos, (Akhurst e Boemare, 1990; Poinar e Thomas, 1966). No entanto, na simbiose constituída por *Steinernema glaseri* e *X. poinarii* os dois parceiros devem estar juntos para que o processo patogénico tenha sucesso. Individualmente, por injeção, nenhum dos simbiontes é capaz de matar o insecto hospedeiro, (Akhurst, 1986).

Os nemátodos são animais metazoários multicelulares considerados como um dos grupos mais abundantes e, frequentemente, descritos como vermes invertebrados simples, incolores, não segmentados, sem apêndices, de corpo em forma cilíndrica, alongada e afilada nas extremidades, (Fig. 1 a,b), revestidos por uma cutícula espessa capaz de suportar uma elevada pressão hidrostática no interior, cujo corpo possui dimensões que variam entre 0,1 mm e vários centímetros de comprimento. Os nemátodos possuem sistemas reprodutivo, muscular, digestivo, secretor/excretor e nervoso mas não possuem órgãos de visão e audição nem sistemas circulatório e respiratório. Na maioria das espécies estes animais possuem os sexos separados (=anfimíticos), no entanto, a partenogênese (somente nas fêmeas) ou o hermafroditismo ocorrem em algumas espécies (Bird e Bird, 1991; Moore, 2001).

Estes animais são seres ubíquos, podem ser encontrados nos ambientes aquático (marinho e de água doce) e terrestre. A maioria são organismos de vida livre, contudo, algumas espécies são parasitas, causando importantes doenças a humanos, animais e plantas. De entre as espécies parasitas contam-se as espécies auxiliares benéficas entomopatogénicas. As associações entre nemátodos e insectos podem estender-se num intervalo que vai desde a fortuita associação facultativa, passando pela associação comensal até à parasita (Kaya e Stock, 1997; Kaya e Koppenhöfer, 1999; Gaugler, 2000).

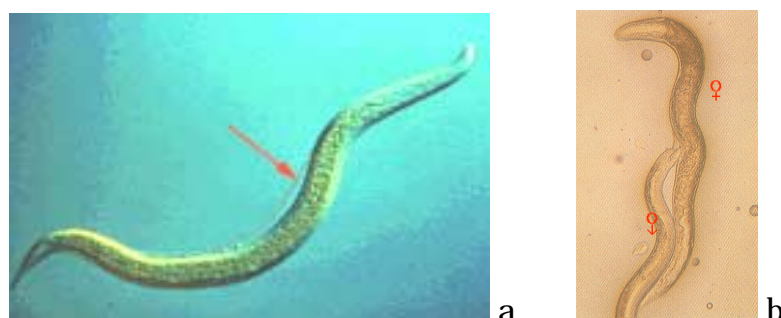


Fig. 1 – Nemátodos pertencentes ao género *Steinernema*.

a) Juvenil infectivo envolvido pela dupla cutícula supranumerária (seta). A extremidade anterior está situada no canto superior direito da fotografia; b) Larvas adultas em posição de acasalamento.

No entanto, só algumas espécies de nemátodos conseguem provocar a morte dos seus hospedeiros e, além disto, nem todas podem ser usadas com êxito contra insectos porque: i) a sua produção em massa é difícil, (e.g., Tetratomatidae) ou onerosa, (e.g., Mermithidae); ii) possuem um pequeno leque de especificidade contra insectos de menor importância económica ou, finalmente, iii) possuem uma virulência bastante modesta, (e.g., Sphaeruliidae) e, como tal, não são indicados para o controlo de insectos pragas (Gaugler, 2000). Os únicos nemátodos parasitas de insectos, que possuem um equilíbrio óptimo de atributos para serem utilizados no controlo biológico integrado, são os nemátodos entomopatogénicos dos géneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*.

No espectro dos auxiliares do controlo biológico, estes indivíduos ocupam um patamar que se situa entre os organismos patogénicos microbianos e os predadores e parasitóides. São portadores das bactérias deletérias para os insectos e possuem a mobilidade para activamente procurar as presas no solo. As relações entre o complexo simbiote nematobacteriano e os insectos situam-se a meio caminho entre a relação hospedeiro-parasita e a relação predador-presas. Com efeito, a infestação do insecto seguida da multiplicação dos nemátodos no interior das lagartas, evoca as modalidades do parasitismo dos parasitóides. Por seu turno, o facto de que o complexo mata rapidamente a sua vítima convida a considerá-lo como um predador. No entanto, invariavelmente, são reagrupados no seio dos organismos patogénicos (=entomopatogénicos) e considerados como agentes auxiliares microbiológicos, presumivelmente, devido às suas relações simbióticas com bactérias (Gaugler e Kaya, 1990).

Os simbiosomas nematobacterianos entomopatogénicos são conhecidos desde o Séc. XVII (Nickle, 1984; Poinar, 1990 e Smart, 1995). No entanto, foi somente na década de sessenta que o saber sobre este tipo de associação e respectivas interacções com os insectos se desenvolveu. Nos estudos de sistemática elaborados por Hominick *et al.* (1996; 1997), os nemátodos entomopatogénicos (Nematoda: Rhabditidae) dividem-se em duas famílias: Steinernematidae (géneros *Steinernema* com 25 espécies e *Neosteinernema* com uma única espécie) e Heterorhabditidae (género *Heterorhabditis* com 9 espécies). Quanto às bactérias simbiosomas é actualmente admitido que estão especificamente associadas com o seu par helmíntico. Assim, o género *Xenorhabdus* (Akhurst, 1993; Akhurst e

Boemare, 1988; Akhurst e Dunphy, 1993; Forst e Neelson, 1996; Nishimura *et al.*, 1994; Thomas e Poinar, 1979) encontra-se associado aos *Steinernema* e o género *Photorhabdus* (Akhurst *et al.*, 1996; Boemare *et al.*, 1993; Fischer-Le-Saux *et al.*, 1999b; Szállás *et al.*, 1997) associado aos *Heterorhabditis*. Quanto às bactérias da espécie *Neosteinernema longicurvicauda*, a única pertencente ao género *Neosteinernema*, ainda não foram identificadas (Nguyen e Smart, 1994; Nguyen, 2001; [<http://www.ifas.ufl.edu/~kbn/50seqcut.htm>]; [<http://www.ifas.ufl.edu/~kbn/MyHTML.htm>]).

## 2. Ciclo de Vida

Os nemátodos entomopatogénicos são vermes helmintas, habitantes do solo, possuem a capacidade de activamente procurar, parasitar e matar insectos. Os estados infectantes dos nemátodos (larvas de juvenis L3), encontram-se livres no solo e estão protegidas do ambiente circundante por uma dupla cutícula (Fig. 1a). Nesta fase do seu ciclo de vida estas larvas não se alimentam e sobrevivem à custa das suas reservas, por conseguinte, estão em quiescência trófica e procuram um insecto hospedeiro no solo. Nesta fase de vida livre os simbiontes bacterianos residem no intestino do nemátodo (Boemare, 1983) e, nos Steinernematidae, estão localizadas numa diferenciação anatómica do tubo digestivo helmíntico, a denominada vesícula de Bird (Bird e Akhurst, 1983), (Fig. 2) enquanto que, no caso dos Heterorhabditidae as bactérias encontram-se disseminadas ao longo do tracto intestinal.

No momento do encontro com as suas presas os nemátodos possuem várias modalidades de infestação das mesmas e a penetração, nos Steinernematidae, (Fig. 3), faz-se pelos orifícios naturais: boca, ânus, respiráculos.

Os parceiros microbianos da simbiose escapam às reacções de defesa da sua presa e matam-na em algumas horas por septicemia e/ou toxemia (Akhurst e Boemare, 1990). Só após a morte do insecto é que os ovos eclodem e o ciclo de vida do nemátodo se inicia. Em simultâneo, as bactérias proliferam exponencialmente e produzem os nutrientes essenciais para o desenvolvimento das larvas pela

biotransformação dos tecidos do cadáver do insecto (Bonifassi, 1987). Além disto, mantêm as condições favoráveis à manutenção de um ambiente monoxénico pela produção de antibióticos que impedem o crescimento de outros microrganismos. Os vermes helmintas cumprem o seu ciclo de vida por várias gerações alimentando-se da biomassa bacteriana e dos produtos do seu metabolismo.

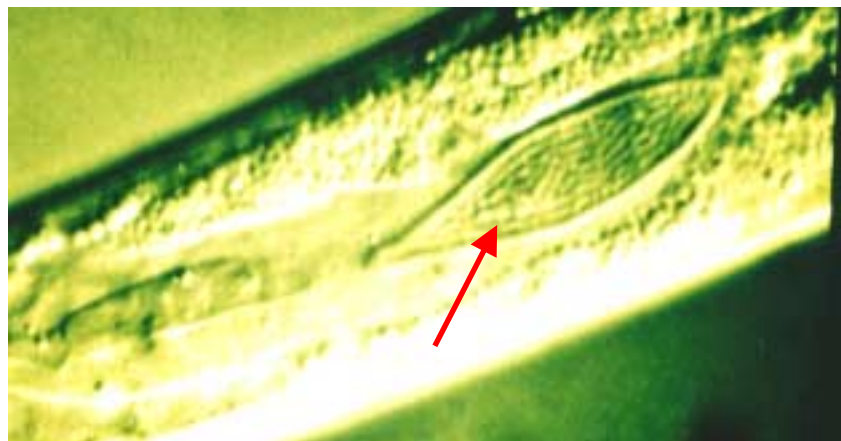


Fig. 2 – Secção longitudinal de uma larva (L3) em estado de resistência trófica ou juvenil infectivo de *Steinernema* sp., mostrando a vesícula intestinal descrita por Bird e Akhurst (1983) contendo a bactéria simbiote *Xenorhabdus* sp. (Foto cedida pelo Dr. R. Akhurst, CSIRO, Canberra)

No entanto, Forst *et al.*, (1997), referem que em *Manduca sexta*, parasitadas pelo complexo nematobacteriano, a morte das lagartas sobrevem antes que a população bacteriana tenha atingido um número elevado consistente com um quadro de septicemia. Este resultado parece indicar que a septicemia não é necessária ou, pelo menos, essencial para a explicação da virulência. Sugerindo, por conseguinte, que as bactérias sintetizam factores tóxicos para o insecto privilegiando a hipótese de toxemia.

Quando se isolam bactérias, a partir dos respectivos nemátodos simbiotes no estado infeccioso, aquelas encontram-se na forma variante denominada de Fase I. Nas culturas bacterianas *in vitro* ou durante a produção em massa de nemátodos, as estirpes de *Xenorhabdus* produzem espontaneamente colónias, as quais são denominadas de variantes de Fase II (Akhurst, 1980; Boemare e Akhurst, 1988). As duas variantes de bactérias, em geral, têm sido referidas como igualmente patogénicas contra as lagartas de *Galleria mellonella* (Akhurst,

1980). No entanto, recentemente, Volgyi *et al.*, (1998) descreveram uma variante Fase II de *X. nematophila* com reduzida virulência contra *M. sexta*.

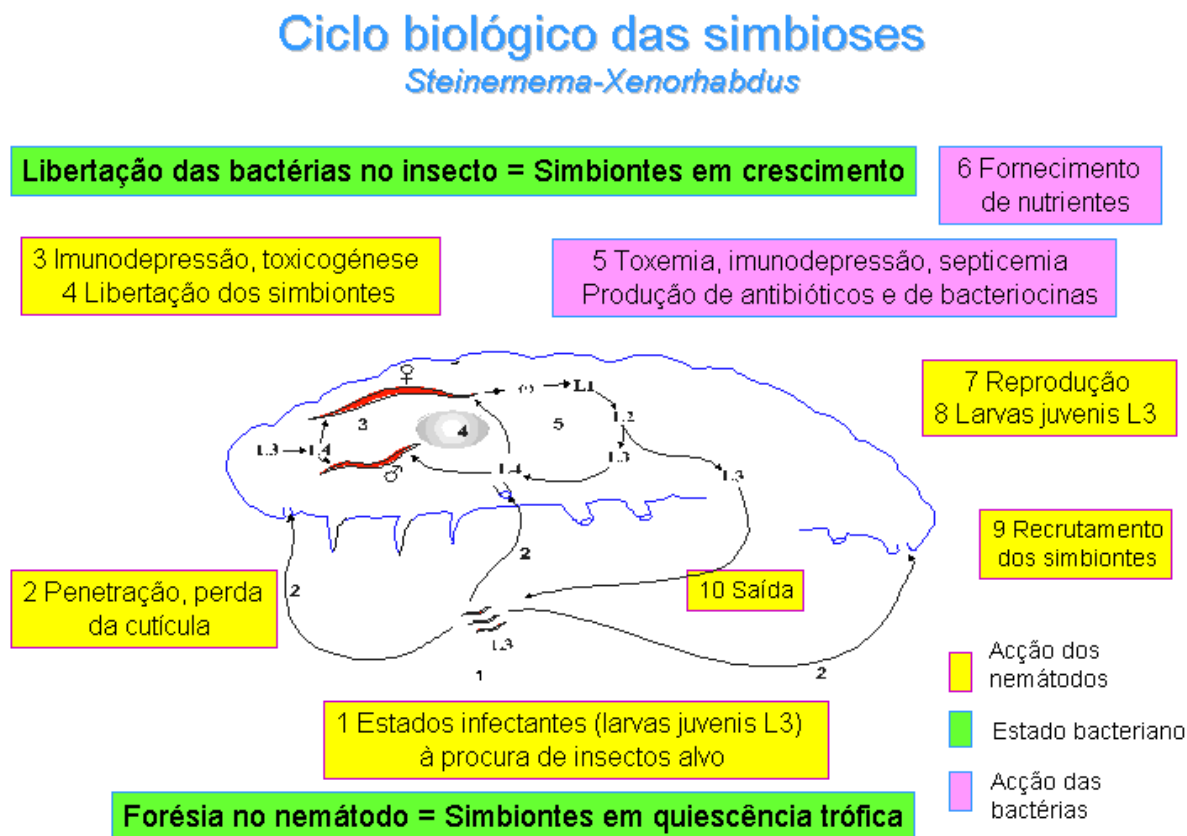


Fig. 3 - Ciclo de vida das simbioses helmíntico-bacterianas *Steinernema-Xenorhabdus*

1. Estado livre telúrico: larvas quiescentes de juvenis infectantes protegidas por uma dupla cutícula.

2 até 6 - Ciclo de parasitismo:

2. Penetração, através das aberturas naturais (boca, ânus, espiráculos), até à cavidade geral do insecto. Perda da velha cutícula supranumerária do segundo estado larvar;

3. Escape ou neutralização das defesas do insecto. Libertação do simbiote bacteriano;

4. Toxemia, septicemia, imunodepressão, produção de antibióticos e bacteriocinas. Morte do insecto;

5. Multiplicação dos nemátodos durante várias gerações;

6. Exaustão dos nutrientes. Saída dos estados larvares após recrutamento das bactérias.

Os nemátodos retornam ao solo no estado de juvenis infectantes, em resistência trófica e revestidos por duas cutículas.

As duas fases variantes de *X. nematophila* podem ser distinguidas por intermédio de um certo número de características diferentes as quais poderão estar envolvidas na virulência contra insectos ou na associação com os nemátodos. De um modo geral, as propriedades da Fase I estão muito atenuadas ou ausentes da Fase II (Givaudan e Lanois, 2000).

Tomadas em conjunto, as bactérias dos géneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, nas formas variantes denominadas de Fase I, são caracterizadas em culturas *in vitro*, pela absorção de corante azul em placas de gelose (NBTA), por possuírem inclusões paracristalinas no seu citoplasma (Boemare, 1983; Boemare *et al.*, 1983; Couche e Gregson, 1987), por serem capazes de produzir proteínas da membrana externa OpnB (Leisman *et al.*, 1995), sintetizarem pili resistentes à manose (Moureaux *et al.*, 1995) e secretarem i) exoenzimas, tais como lipases, lecitinases (Thaler *et al.*, 1998), quitinases (Chen *et al.*, 1996) e proteases (Schmidt *et al.*, 1988; Bowen *et al.*, 2000); ii) toxinas (Bowen *et al.*, 1998 a,b; Blackburn *et al.*, 1998; ffrench-Constant e Bowen, 1999; Guo *et al.*, 1999), citotoxinas capazes de lisar os hemócitos e impedindo as reacções de defesa celular (Ribeiro *et al.*, 1999) e hemolisinas (Givaudan e Lanois, 2000; Brillard *et al.*, 2001); iii) antibióticos (Paul *et al.*, 1981; Maxwell *et al.*, 1994; McInerney *et al.*, 1991a; McInerney *et al.*, 1991b; Akhurst, 1982; Richardson *et al.*, 1988), fungicidas ou compostos antifúngicos (Li *et al.*, 1995b; Chen *et al.*, 1994) e bacteriocinas, antibióticos ou compostos antimicrobianos (Baghdiguiian *et al.*, 1993; Thaler *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1995a 1997). Este conjunto de factores de patogenicidade e virulência são capazes de *in vivo*, matarem o insecto hospedeiro, inibirem a colonização e, conseqüente, putrefacção do cadáver por outros microrganismos competidores presentes no intestino do próprio insecto ou no ambiente telúrico circundante e, finalmente, de biotransformarem os seus tecidos originando o alimento de que os nemátodos carecem.

A entomotoxicidade daquelas bactérias está bem documentada mas só pode ser observada se forem inoculadas na cavidade geral do insecto. Por seu turno, nenhum efeito se observa *per os* dado que as bactérias são incapazes de ultrapassar a barreira do tubo digestivo. Desta forma, os nemátodos funcionam como "seringas vivas" capazes de transportar e proteger o seu simbionte bacteriano até ao hemocélio do insecto. Existe, porém, uma excepção relacionada com a espécie *X. nematophila*, que apresentou capacidades insecticidas *per os* (Morgan *et al.*, 1999) juntando-se aos resultados recentemente publicados para *P. luminescens* com o mesmo teor Bowen *et al.*, (1998 a,b); Blackburn *et al.*, (1998); ffrench-Constant e Bowen, (1999; 2000), em que foi referenciada uma entomotoxina capaz de induzir alterações nas células do epitélio do intestino

médio de lagartas neonatas de *M. sexta*. Por sua vez, Guo *et al.*, (1999) refere a virulência *per os* de uma entomotoxina sobre lagartas neonatas de *Diabrotica undecimpunctate*.

Numa perspectiva moderna, a análise das relações entre o insecto hospedeiro e o par simbiote entomopatogénico, em particular a bactéria, pode-se considerar que se está em presença de um encontro de organismos com tipos diferentes de informação genética com estratégias opostas: os genes dos agentes infecciosos visam assegurar-lhes a melhor sobrevivência no meio ambiente, ou seja, conferir-lhes a melhor capacidade em colonizar e infectar o organismo hospedeiro permitindo a ulterior multiplicação da bactéria e do nemátodo. Por seu lado, o organismo hospedeiro possui genes implicados na imunidade inata não específica que codificam a produção de moléculas capazes de opsonizar, neutralizar e/ou eliminar o agente infeccioso. Este combate é particularmente interessante nos vertebrados, designadamente, nos mamíferos, nos quais, além da imunidade inata não específica, existem mecanismos de imunidade específica adquirida, ausentes nos invertebrados e, em particular nos insectos, que codificam a produção de receptores membranares, de enzimas, de mediadores solúveis e de anticorpos, capazes de neutralizar e/ou eliminar o agente infeccioso.

A eficiência com a qual o par nematobacteriano mata o seu hospedeiro varia com a espécie de insecto considerada, com o seu estado imunológico e fisiológico e com a bactéria presente na simbiose (Akhurst e Dunphy, 1993). Para que possam efectuar a sua multiplicação na hemolinfa as bactérias devem ser capazes de tolerar a resposta defensiva do hospedeiro, evadir-se ao reconhecimento como corpo estranho e/ou suprimir as defesas humorais e celulares. Nos insectos a reacção de defesa celular inicial a uma infecção bacteriana é a fagocitose e, quando o número de bactérias é muito elevado, é coadjuvada pelo mecanismo de formação de nódulos (Dunn, 1986; Ratcliffe, 1986; Ratcliffe e Rowley, 1984; Dunphy e Thurston, 1990).

Quando injectadas directamente na cavidade geral do insecto (Dunphy e Webster, 1984; 1988 a,b), as bactérias são capazes de proliferar no hemocélio do mesmo e, após a sua morte, aí efectuar o seu ciclo vital. Este facto parece demonstrar que estas bactérias estão bem adaptadas à situação de tolerar,

escapar ou destruir a resposta imunitária do hospedeiro. No entanto, o modo como o fazem é quase desconhecido. Sabe-se que as defesas imunitárias dos insectos, são toleradas pela bactéria e são de todo ineficazes, designadamente, as defesas celulares (fagocitose e encapsulamento) e as humorais (lisozima) (Forst e Nealson, 1996; Forst *et al.*, 1997), que a actividade fenoxidásica é inibida (Dunphy e Webster, 1988 a,b; Brehélin *et al.*, 1989; Dunphy e Webster, 1991) e que a actividade proteolítica, por exemplo, dos extractos de cultura de *P. luminescens* está correlacionada *in vitro* e *in vivo* com a inibição da actividade das cecropinas produzidas por *Hyalophora cecropia* e *G. mellonella* (Jarosz, 1998). Acresce que, em muitos casos, a LD<sub>50</sub> é ±1 células bacterianas viáveis, dependendo dos estados larvares e da espécie do insecto em estudo (Wulff *et al.*, 1994; Peters e Ehlers, 1994; Pye e Burman, 1977). Em *G. mellonella* são suficientes 1-10 células viáveis de *X. nematophila* para provocar a morte de uma lagarta (Akhurst e Boemare, 1990; Boemare *et al.*, 1997b).

Num artigo de revisão em abordagem de patologia comparada, elaborada por Fussenegger (1997), refere que as bactérias, na generalidade, provocam doenças em mamíferos hospedeiros por intermédio de processos multifacetados que envolvem numerosos componentes, cada um dos quais imprescindível para o processo patológico. Os determinantes da virulência bacteriana incluem factores variados que permitem i) colonização de um nicho anatómico-fisiológico específico do hospedeiro; ii) evasão às respostas imunitárias; iii) invasão de tecidos e/ou células do organismo ou iv) toxicidade directa contra o hospedeiro.

A maior parte das bactérias patogénicas produzem factores de virulência que são capazes de franquear ou destruir as barreiras cutâneas e muco/epiteliais e, além disto, destruir as células responsáveis pelas defesas imunitárias. De facto, a maioria dos factores de virulência pertencem ao grupo das citotoxinas, citolisinas ou hemolisinas, além destas, estão também referidas várias enzimas, tais como, lipases, fosfolipases e proteases, como estando envolvidas nos processos de parasitismo bacteriano.

### 3. As toxinas de origem bacteriana

Numerosas espécies bacterianas produzem factores de virulência cuja função é a de causar alterações na fisiologia do hospedeiro ou nos seus mecanismos de defesa, de tal modo que possibilitem a proliferação e/ou difusão bacteriana. Estes factores são, na maior parte, moléculas de natureza proteica e são denominadas por toxinas bacterianas. Dependendo do seu modo de acção as toxinas bacterianas podem se divididas em dois grandes grupos: i) toxinas com acção sobre a membrana celular ou ii) toxinas com acção sobre alvos intracelulares.

As toxinas proteicas bacterianas, cerca de 325 (Popoff, 2000), apresentam uma grande diversidade na sua dimensão, na sua estrutura e no seu mecanismo de acção. A primeira etapa da interacção das toxinas com as células é o reconhecimento de um receptor da superfície membranar. Certas toxinas actuam ao nível da membrana pela formação de poros, pela modificação enzimática de lipídios ou de proteínas membranares, pela alteração da transdução dos sinais intra e/ou intercelulares. As estratégias de interacção das toxinas bacterianas e as células eucariótas são muito diversificadas e o seu estudo bastante exaustivo. Neste capítulo abordaremos sucintamente este tema, remetendo para a bibliografia disponível, os eventuais aprofundamentos desta matéria (Braun e Focareta, 1991; Parker e Pattus, 1993; Menestrina *et al.*, 1994; Boquet *et al.*, 1998; Kourie e Shorthouse, 2000; Alouf, 2000; Boquet e Gauthier, 2000; Falnes e Sandvig, 2000; Popoff, 2000; Poulain *et al.*, 2000; Olsnes *et al.*, 2000) e todos os artigos recentemente publicados no “Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 145 – Bacterial Protein Toxins, Ed. K.Aktories e I.Just, Springer-Verlag, 2000”.

### **3.1. Citolisinas: Toxinas bacterianas com acção sobre a membrana celular**

As citolisinas pertencem a um grande grupo de toxinas que actuam sobre a membrana celular. Elas atacam a célula alvo pelo aumento, muitas vezes, não específico da permeabilidade crítica da membrana celular a iões e a pequenas moléculas. O efeito de permeabilização pode ser letal se for suficientemente forte para alterar a capacidade de regulação homeostática da célula alvo atacada, para além da sua capacidade de resposta para repor o equilíbrio iónico perdido. As toxinas capazes de induzir perturbações nas membranas celulares ou toxinas membranolíticas estão classificadas do seguinte modo: i) toxinas formadoras de poros, as quais produzem lesões bem definidas nas membranas; ii) toxinas que produzem danos de origem enzimática (fosfolipases e esfingomielas) e, iii) toxinas que possuem somente um efeito detergente sobre os lípidos.

#### **3.1.1. Toxinas formadoras de poros**

Numerosas espécies bacterianas produzem toxinas proteicas solúveis mas que são capazes de sofrer mudanças na sua conformação do estado hidrófilo a anfipático tornando-se, assim, capazes de estabelecer interacção com o plasmalema das células eucariontes.

Os efeitos das toxinas formadoras de poros são vários e graduais dependendo do tipo de toxina e da sua concentração. No entanto, pode estabelecer-se uma classificação genérica: a) a baixas ou sub-líticas concentrações as toxinas podem induzir um certo número de efeitos que reduzem drasticamente a capacidade de resposta imunitária do hospedeiro: inibição da mobilidade ou quimiotaxia; indução da apoptose; estimulação da libertação dos mediadores da resposta inflamatória e de citocinas; b) em concentrações cada vez mais elevadas as toxinas podem inibir ou abolir a fagocitose, desestabilizar a bicamada lipídica e o citoesqueleto e, finalmente, provocar a lise por rebentamento colóide-osmótico das células (Braun *et al.*, 1991; Menestrina *et al.*, 1994; Boquet *et al.*, 1998; Alouf, 2000; Popoff, 2000; Kourie e Shorthouse, 2000).

### 3.1.2. Toxinas com acção detergente

Algumas bactérias patogénicas produzem toxinas citolíticas que actuam por intermédio das suas propriedades anfipáticas tensioactivas, funcionando como detergentes, provocando a desorganização membranar pela solubilização dos constituintes lipídicos ou proteicos agindo como um dispersante (Menestrina *et al.*, 1994; Alouf, 2000).

### 3.1.3. Toxinas com acção enzimática

Finalmente, outras bactérias produzem enzimas que hidrolisam os fosfolípidos das membranas das células eucariótas como, por exemplo, vários tipos de fosfolipases: Fosfolipases A2, Ce D; Esfingomielase e Colesterol oxidase (Menestrina *et al.*, 1994; Alouf, 2000). Estes agentes enzimáticos por si próprios, ou mais frequentemente, em colaboração de outras enzimas ou factores, são capazes de induzirem a lise celular.

## 3.2. Toxinas bacterianas com acção sobre alvos intracelulares

Existem numerosas toxinas proteicas, de origem bacteriana, que exercem os seus efeitos no interior das células alvo dos organismos hospedeiros. O seu modo de acção modifica os parâmetros fisiológicos normais e faz-se sentir por intermédio de uma sequência de quatro etapas distintas: 1) estas toxinas para efectuarem a adesão celular possuem um promotor de ligação, constituído por um polipéptido simples ou por múltiplas sub-unidades polipeptídicas. Os promotores de ligação com um único domínio de ligação reconhecem um receptor proteico na superfície membranar, enquanto as toxinas com múltiplos domínios de ligação reconhecem resíduos polissacarídicos específicos, ligados a proteínas ou a lípidos, na hemicamada externa do plasmalema das células alvo; 2) a etapa seguinte é a interiorização do complexo toxina receptor que se efectua tanto por um processo

de endocitose mediada por receptores como de fase fluida (Menestrina *et al.*, 1994). Algumas toxinas remontam o sistema endomembranar, pela via do complexo de Golgi até ao retículo endoplásmico, outras remontam a via endossomal até aos lisossomas; 3) a terceira etapa é denominada por translocação membranar da toxina para o citoplasma. Com efeito, a molécula que se encontra no interior de uma vesícula, em ambiente topologicamente extracelular, carece de se fazer translocar ao citoplasma para, uma vez aí chegada, poder exercer a sua acção sobre os diversos alvos intracelulares; 4) finalmente, a quarta etapa, é a modificação do alvo presente no citoplasma, cuja natureza pode ser, estrutural (alteração da polimerização da actina), enzimática (ribosilação do ADP, proteólise, glucólise, glucosilação ou desaminação de uma molécula alvo) ou reguladora (moléculas intervenientes nas vias de sinalização e regulação celular) (Braun e Focareta, 1991; Menestrina *et al.*, 1994; Olsnes *et al.*, 2000). Com efeito, as toxinas intracelulares podem interagir com o citoesqueleto de actina ou com os sistemas da sua regulação, designadamente com as proteínas G da família Rho, com os sistemas de transdução do sinal e de excitação, com as vias de sinalização da activação do mensageiro secundário, com a inibição da síntese proteica, com a alteração da via de proliferação/diferenciação mediada por Ras (Menestrina *et al.*, 1994, Boquet *et al.*, 1998; Popoff, 2000).

## **4. Dados sobre o Sistema Imunitário dos Insectos**

No sistema imunitário dos animais, além da componente das defesas constitutivas ou inatas do organismo (e.g. Spitznagel, 1999), existe a componente dita de induzida ou adquirida que autoriza uma luta específica contra os agentes patogénicos, nomeadamente, com a ajuda de anticorpos que apresentam uma forte afinidade e uma grande especificidade em presença de um agente agressor (e.g. Ziegler, 1999). Contudo, esta imunidade adaptativa apareceu tardiamente no decurso da evolução e em exclusivo no tronco ao qual pertencem os vertebrados. Estima-se que cerca de 80% dos seres vivos animais vivem sem este sistema elaborado de defesa, apesar de muitos invertebrados possuírem uma

longevidade apreciável e de, também, viverem em contacto com vírus, bactérias, fungos e parasitas. Numerosas vezes, contudo, estes agentes biológicos infecciosos conseguem colocar em xeque as defesas dos organismos hospedeiros (Plaut, 1999) desenvolvendo estratégias complexas de ataque, mimetismo ou contornamento das mesmas.

Actualmente sabe-se que os invertebrados estão protegidos graças a um sistema de defesa não adaptativo ou inato que começa a ser, particularmente, bem conhecido com especial ênfase nos insectos. Este grupo de animais, que se estima poder compreender vários milhares de espécies, ocupa habitats que se espalham por todos os biótopos terrestres.

A maioria dos insectos possuem células equivalentes aos leucócitos mas não apresentam células equiparadas aos eritrócitos. Os leucócitos ou glóbulos brancos encontram-se em suspensão no líquido que enche o hemocélio e denominam-se hemócitos. Em termos evolutivos o único tipo de células que mantém uma presença constante, através de todo o Reino Animal, é o das células fagocíticas as quais correspondem aos macrófagos dos mamíferos mas que, apesar de funcionalmente idênticas, parece não possuírem os mesmos receptores à superfície do plasmalema (Horton e Ratcliffe, 1993). Nos insectos, os hemócitos são as células envolvidas nos mecanismos de defesa, sendo o seu estudo de primordial importância, para a compreensão de como é que se opera a reacção contra os agentes patogénicos e de como é que estes agentes evitam as reacções de defesa do hospedeiro.

O sistema imunitário inato dos insectos compreende células livres, circulando na hemolinfa e, órgãos compostos por diferentes tipos de tecidos. Tal qual hoje em dia é entendido, todos os componentes do sistema imunitário dos insectos possuem uma origem mesodérmica e englobam: i) os corpos gordos, ii) a glândula linfática e iii) os hemócitos (Hartenstein *et al.*, 1992; Ruggendorff *et al.*, 1994; Tepass *et al.*, 1994). Os hemócitos estão activamente envolvidas nas defesas imunitárias, tendo sido objecto de caracterização segundo critérios morfológicos e funcionais (Brehélin e Zachary, 1986), além de critérios serológicos por intermédio de anticorpos monoclonais (Trenczek e Bennich, 1990; Chain *et al.*,

1992; Mullet *et al.*, 1993; Willott *et al.*, 1994, 1995; Strand e Johnson, 1996; Hori *et al.*, 1997).

Nos insectos tal como nos mamíferos, as reacções de defesa do sistema imunitário estão divididas em duas categorias: reacções de defesa humoral (Boman, 1982 a,b; Boman *et al.*, 1987; Boman e Hultmark, 1987; Faye *et al.*, 1975; Götz e Boman 1985) e celular (Boman e Hultmark, 1987; Salt, 1970). Quando a entidade que age directamente contra o corpo estranho é uma molécula solúvel no plasma, diz-se que se trata de imunidade humoral. Pelo contrário, se essa entidade é uma célula diz-se então que se trata de imunidade celular. Nos insectos, assim como em vários outros grupos de invertebrados, a resposta celular é assegurada pelos hemócitos, ou sejam, os elementos figurados ou células livres da hemolinfa que, por sua vez, é o líquido que banha todos os tecidos da cavidade geral ou hemocélio, sendo o equivalente do sangue dos vertebrados. A dicotomia entre reacções humorais e reacções celulares é, bem entendido, uma comodidade de linguagem. Com efeito, as células intervêm na imunidade humoral, por exemplo, pela síntese de moléculas activadoras e, de igual modo, as moléculas solúveis no plasma participam nas reacções celulares para as modular em termos de sinergismos ou antagonismos.

Contudo, pode considerar-se que as reacções de defesa humoral nos invertebrados incluem a melanização (Johansson e Söderhäll, 1996; Söderhäll e Aspan, 1993; Söderhäll *et al.*, 1994; Ashida, 1990; Ashida e Yamazaki, 1990), coagulação e/ou gelificação da hemolinfa (Brehélin, 1971, 1972, 1979 a,b; Bohn, 1986; Bohn e Barwig, 1994; Barwig, 1985; Spence e Minnick, 1991) e síntese de péptidos antimicrobianos (Hoffmann e Hoffmann, 1990; Boman e Hultmark, 1987; Götz e Boman, 1985; Boman, 1991; Boman *et al.*, 1987; Götz e Trenczek, 1991; Kaaya, 1993; Hetru *et al.*, 1994; Natori, 1994; Ferrandon *et al.*, 2000), enquanto que, as reacções de defesa celular são constituídas pelas reacções de fagocitose (Brehélin e Hoffmann, 1980; Brehélin e Arcier, 1985; Gagen e Ratcliffe, 1976; Ratcliffe e Rowley, 1979; Ratcliffe *et al.*, 1985), formação de nódulos e encapsulamento (Schmit e Ratcliffe, 1977; Pech e Strand, 1996). A evidente interdependência desta dicotomia está patente numa panóplia de moléculas, com função de receptores e/ou de sinalização inter e intracelulares, que estabelecem a cada passo a ligação funcional entre as reacções humorais e celulares (Vilmos e

Kurucz, 1998; Gillespie *et al.*, 1997). Em particular, as cascatas proteásicas que conduzem à melanização e à coagulação, assim, como as lectinas e a hemolina, parecem estar intimamente relacionadas com a opsonização dos corpos estranhos e a activação das reacções de fagocitose, nodulação e encapsulamento e serão abordadas brevemente neste capítulo introdutório.

Os insectos têm um sistema circulatório aberto e a sua hemolinfa possui vários grupos de hemócitos com funções distintas. Dois desses tipos de células, designadamente, nos lepidópteros, estão directamente envolvidos nas reacções de defesa celular: os granulócitos e os plasmatócitos. As defesas celulares estão bastante desenvolvidas nos insectos e apresentam dois tipos distintos de reacções: i) a fagocitose e ii) um mecanismo multicelular de formação de nódulos e de cápsulas. Nestas últimas reacções, o corpo estranho, demasiado grande para ser fagocitado, é isolado do resto do corpo do insecto por camadas celulares sucessivas e concêntricas que se dispõem à sua superfície formando um invólucro.

## **4.1. As Reacções de Defesa Celular**

### **4.1.1. Fagocitose**

Mediante as dimensões dos materiais e partículas a ingerir é provável que os mecanismos tanto de endocitose mediada por receptores e/ou endocitose de fase fluida (=pinocitose), assim como, os fenómenos de secreção ou exocitose, ocorram nos insectos do mesmo modo que nos mamíferos. Nos insectos pouco se sabe sobre o conjunto destas reacções, nas suas versões constitutivas, reguladas ou estimuladas, mas começam a existir algumas evidências de que são semelhantes tanto nos vertebrados como no vasto conjunto dos invertebrados.

A fagocitose, porém, tem sido estudada em vários grupos de invertebrados, e a evidência experimental entretanto obtida é maioritariamente favorável à hipótese de que os mecanismos envolvidos funcionam de um modo muito

semelhante aos dos mamíferos, que se apresentam evolutivamente conservados e coerentes (Bayne, 1990; Horton e Ratcliffe, 1993; Ottaviani e Franceschi, 1997; Ottaviani *et al.*, 1995; Franchini *et al.*, 1996a; Vilmos e Kurucz, 1998; Hoffmann *et al.*, 1999; Ferrandon *et al.*, 2000).

Nos insectos, os fenómenos que concernem à fagocitose são pouco conhecidos, porque esta reacção de defesa celular tem sido essencialmente estudada nos seus aspectos morfológicos Gagen e Ratcliffe (1976) e Ratcliffe e Rowley (1979) e, para referências adicionais, consultar Pathak (1993), Götz (1986) e Wago (1991). Só muito recentemente, porém, é que se iniciaram alguns estudos que focalizaram a atenção nos mecanismos moleculares que regulam o reconhecimento dos organismos invasores e a subsequente fagocitose ou nodulação e/ou encapsulamento.

Nos animais, a fagocitose está a cargo dos macrófagos que são células extraordinariamente versáteis, encontradas em praticamente todos os tecidos do corpo e definidos como as sentinelas do sistema imunitário (Allen e Aderem, 1996; Aderem e Underhill, 1999). Com efeito, é nesta condição que estas células exploram o seu completo repertório funcional por intermédio da detecção, ingestão e destruição dos agentes infecciosos, participando, ainda, na remoção das células apoptóticas, selagem de feridas e em várias mecanismos ligados ao desenvolvimento e à remodelação de tecidos, designadamente, o ósseo (Morrissette *et al.*, 1999).

Como fenómeno estimulado, a fagocitose, é efectuada por células especializadas, ocorrendo nos insectos sem que, no reconhecimento, haja intervenção de anticorpos opsonizantes do corpo estranho a neutralizar. Contudo, a fagocitose é favorecida pelas lectinas do plasma e de componentes da cascata da polifenol oxidase. Nos lepidópteros, o essencial da fagocitose é realizado pelos granulócitos ou hemócitos granulares de tipo I (Brehélin e Zachary, 1986), que são as células equivalentes aos macrófagos dos mamíferos. Estas células são muito eficazes na remoção e destruição de agentes microscópicos bacterianos.

Nos insectos, especialmente nos lepidópteros, a fagocitose mediada pelos granulócitos, o encapsulamento e/ou a formação de nódulos, mediada pelos granulócitos e plasmatócitos, é precedida pela perda de uma parte do conteúdo

granular/vesicular dos granulócitos (Pathak, 1993; Götz, 1986; Ratcliffe, 1991) aquando do contacto com o corpo estranho, por intermédio de um fenómeno que se pode equiparar ao de exocitose estimulada. Pensa-se que seja possível que o fenómeno de desgranulação destas células represente um mecanismo responsável pela opsonização da partícula dado que se observa a libertação de um lote variado de substâncias nas quais se incluem componentes da cascata da profenoloxidase, da matriz extracelular viscosa, responsável pela indução da coagulação e, eventualmente, factores de recrutamento de um outro tipo adicional de células como, por exemplo, os plasmatócitos (Horton e Ratcliffe, 1993; Wago, 1991). Neste aspecto, não podem deixar de ser referidos os trabalhos de Marmaras e Tsakas (1988) e Charalambidis *et al.* (1995), nos quais foram evidenciados a produção hemocitária de uma proteína com 47 kDa. Esta proteína parece ocorrer associada à membrana celular dos hemócitos granulares e no interior dos seus conteúdos vesiculares. A sua subsequente secreção é estimulada pelos LPS e dependente da fosforilação da tirosina (Charalambidis *et al.* 1996a). Estas respostas hemocitárias à presença de LPS assemelham-se bastante com as encontradas nos macrófagos de mamíferos (Weinstein *et al.*, 1993).

Apesar de os insectos não possuírem o complexo antigene-anticorpo, porque são incapazes de sintetizar moléculas do tipo anticorpo, possuem um sistema de defesa muito eficaz contra invasores estranhos. Com efeito, existem moléculas de outro tipo, como sejam, as lectinas, capazes de intervirem e de efectuarem a opsonização das partículas estranhas. Em *Locusta migratoria* a lectina purificada por Drif e Brehélin, (1994) demonstrou possuir um efeito opsonizante de corpos a fagocitar muito importante tanto *in vivo* como *in vitro*.

Por seu turno, os granulócitos possuem uns receptores membranares que parecem ser particulares somente aos insectos enquanto que outros são comuns aos insectos e aos mamíferos. Recentemente, tem sido dada importância crescente ao estudo das moléculas envolvidas nos processos de fagocitose. Os receptores presentes e descritos à superfície das células fagocíticas nos insectos exibem similaridades espantosas com as existentes nas células congéneres dos vertebrados. Com efeito, os receptores proteicos denominados por Malvolio (Rodrigues *et al.*, 1995) e dSR-Cf (Pearson *et al.*, 1995) mostram homologia, respectivamente, com NRAMP-1 dos macrófagos de ratinho (proteína-1 da

resistência natural associada à membrana dos macrófagos) e com os receptores da Classe A dos macrófagos de mamíferos e, além destes, a proteína Croquemort (CRQ), (Franc, 2000; Franc *et al.*, 1996, 1999 a,b), é um membro da superfamília dos receptores do tipo CD36 que medeia, também, o reconhecimento das células apoptóticas. A CRQ é expressa, em exclusiva restrição, nos hemócitos fagocíticos (granulócitos=macrófagos) durante embriogênese imediatamente após os primeiros sinais de apoptose.

Com efeito, em *Drosophila melanogaster* (=Drosophila), os hemócitos embrionários removem as células que estão destinadas a morrer durante a embriogênese. No final da embriogênese, aproximadamente 90-95% dos hemócitos tornaram-se células fagocitárias (Tepass *et al.*, 1994). Estes hemócitos fagocitários possuem *in situ* características similares aos macrófagos de mamíferos (Tepass *et al.*, 1994; Abrams *et al.*, 1992, 1993; White *et al.*, 1994).

A remoção das células apoptóticas e de microrganismos é mediada via fagocitose. As células fagocíticas, os macrófagos dos mamíferos e os hemócitos dos insectos, expressam receptores membranares de reconhecimento de certos padrões moleculares (PRRs) os quais reconhecem especificamente os padrões moleculares associados às membranas das células apoptóticas (ACAMPs). Existem evidências experimentais confirmando que, tanto os mamíferos como os insectos, possuem e utilizam os PRRs e ACAMPs nos seus mecanismos de limpeza e remoção de células. Além disso, alguns PRRs reconhecem não só células apoptóticas mas também microrganismos, sugerindo que poderá existir uma sobreposição entre estas funções (Franc *et al.*, 1999b). No entanto, a evidência genética mostrou que a proteína receptora CRQ, é essencial para a fagocitose das células apoptóticas mas que não necessária para a remoção de bactérias. A expressão da CRQ é regulada pela quantidade de células em apoptose. Estes resultados definem duas vias distintas para a fagocitose de células e de bactérias em *Drosophila*. Está bem estabelecido que a morte celular programada ou apoptose é uma parte integrante do desenvolvimento de todos os metazoários e que as células destinadas a serem substituídas são removidas muito rapidamente pelos processos de fagocitose. Os mecanismos de fagocitose de células apoptóticas e de bactérias patogênicas parece ser muito semelhante. Esta hipótese configura uma questão científica que é a de saber se os resultados do

estudo da fagocitose durante o desenvolvimento embrionário poderão ser extensivos ao conhecimento dos mecanismos de fagocitose dos microrganismos (Franc *et al.*, 1999 a,b).

Uma outra proteína chamada Peroxidasina tem grande homologia com as peroxidases dos macrófagos dos mamíferos e na sua estrutura contém quatro domínios C2 do tipo imunoglobulina que inclui a região da ansa IgA I (Nelson *et al.*, 1994). Acresce que a homologia entre o Malvolio e o NRAMP-1 sugerem que a via do óxido nítrico dos macrófagos dos mamíferos também poderá ser encontrada nos hemócitos de insectos (Vilmos e Kurucz, 1998).

Todas estas homologias sugerem que as células fagocíticas poderão ter evoluído de uma célula ancestral comum de onde derivaram com a conservação estrita de algumas moléculas importantes (Rodrigues *et al.*, 1995). Esta hipótese foi recentemente reanalisada porque foi demonstrado que os linfócitos B-1 humanos se transformavam em macrófagos capazes de efectuarem a fagocitose (Borrello *et al.*, 1996). Assim sendo, as células B-1 representam pré-linfócitos que combinam a especificidade da resposta do sistema imunitário adaptativo, a produção de anticorpos, com o mecanismo de defesa inato, a fagocitose (Plytycz e Seljelid, 1997).

Franchini *et al.*, (1996b) mostraram que, em presença de corpos estranhos na hemolinfa do díptero *Calliphora vomitoria*, os plasmatócitos e os granulócitos, envolvidos nas reacções de encapsulamento e de fagocitose, eram capazes de produzir moléculas muito semelhantes à ACTH (hormona adrenocorticotrópica) e ao  $\alpha$ -TNF (factor- $\alpha$  da necrose tumoral) dos vertebrados. Neste trabalho foi postulado que, pelo menos, a ACTH devia estar intimamente ligada com a fagocitose. Ambas as moléculas pertencem a um grande grupo de agentes quimio moduladores ou quimioactivadores dos monócitos dos vertebrados.

Os lipopolissacáridos (LPS) constituintes da membrana externa das bactérias Gram negativas têm sido implicados na activação de vários sistemas de defesa dos insectos. De entre estes destacam-se a endocitose mediada por receptores de LPS ou a fagocitose de bactérias Gram negativas pelos hemócitos. De facto, tem vindo a ser demonstrado que os hemócitos de insectos, em resposta à presença de lipopolissacáridos (LPS) de bactérias Gram negativas, são

activados no sentido de efectuarem o reconhecimento e a interiorização de LPS associados à bactéria ou livres (Charalambidis *et al.*, 1996a). Esta resposta hemocitária tem como reacção inicializadora o reconhecimento, por intermédio de um receptor específico p47, que envolve a fosforilação da tirosina (Charalambidis *et al.*, 1995). Foi evidenciada, nos hemócitos de *Drosophila*, a síntese de uma glicoproteína, denominada DS47, homóloga das proteínas secretadas pelos macrófagos de mamíferos as quais possuem funções opsonizantes e activadoras da fagocitose (Kirkpatrick *et al.*, 1995). Mais recentemente, foi evidenciado que a fagocitose de *Escherichia coli* pelos hemócitos de insectos requer i) para o reconhecimento e adesão a activação da via de transdução de sinal das proteínas cinases associadas ao RAS/Mitogen e ii) para a interiorização é necessário a presença de uma integrina do tipo  $\beta_3$  (Foukas *et al.*, 1998). Uma outra manifestação da fagocitose e da cooperação sinérgica entre reacções humorais e celulares é a que ocorre em *Bombyx mori* durante a qual são libertados LPS pelos hemócitos que conduzem à activação dos genes codificadores dos péptidos antibacterianos (Taniai *et al.*, 1995, 1997).

#### 4.1.2. Nodulação e Encapsulamento

A formação de nódulos é um fenómeno de resposta a agentes estranhos que não puderam ser removidos da circulação pela fagocitose, por exemplo, um número muito elevado de bactérias. A formação de nódulos é basicamente um fenómeno coadjuvante da fagocitose e, durante o processo, os hemócitos, em particular, os granulócitos, agregam-se em redor dos corpos estranhos, designadamente, de bactérias, imobilizando-as e fixando-as aos tecidos. Neste mecanismo a desgranulação do conteúdo vesicular dos granulócitos que, de seguida, degeneram, é directamente responsável pela coagulação local da hemolinfa que, por sua vez, impede a mobilidade desses agentes microbiológicos. Desta forma, os invasores ficam retidos no coágulo, cuja zona central melaniza, à medida que vai ficando rodeada por diversas camadas de hemócitos granulares degenerados (Davies e Siva-Jothy, 1991) as quais podem ser complementadas por novas camadas de plasmatócitos (Dunphy e Thurston, 1990). Além disto, a lectina

denominada escolexina, foi responsabilizada pela formação de nódulos em *M. sexta*. Esta lectina é produzida pelas células epidérmicas e epiteliais do intestino médio após infecção bacteriana (Kyriakides *et al.*, 1995). Por seu turno, os hemócitos de *Ceratis capitata*, após estimulação pelos LPS, secretam uma proteína de 47 kDa que agrega as células de *E. coli* em presença de tirosina e de tirosinase (Marmaras *et al.*, 1994). Recentemente, foram também purificadas, da fracção membrana dos hemócitos de *Tenebrio molitor*, proteínas que intervêm no processo de encapsulamento (Cho *et al.*, 1999), algumas das quais possuem uma verdadeira função de activar o espalhamento fibroblástico e a adesividade dos plasmatócitos sobre superfícies de aderência (Wang *et al.*, 1999; Strand e Pech, 1995; Clark *et al.*, 1997, 2001a,b; Davies *et al.*, 1988; Volkman *et al.*, 1999). Na hemolinfa de *Bombyx mori* foi purificada uma proteína que reconhece especificamente os LPS (Koizumi *et al.*, 1997) e que participa na promoção da reacção de nodulação mediada pelos hemócitos, em defesa contra a invasão de bactérias Gram-negativas, por intermédio da opsonização das células do agente invasor (Koizumi *et al.*, 1999).

Contudo, quando os agentes invasores são multicelulares e/ou macroscópicos, o processo desencadeia-se de um modo muito semelhante mas, nestes casos, a nodulação é continuada pelos plasmatócitos. Estas células inicialmente possuem uma forma arredondada ou esférica mas, em contacto com o corpo estranho ou após activação por factores opsonizantes libertados pelos granulócitos, adquirem uma forma fibroblástica achatada com plasticidade e aderência adaptável ao recobrimento da sua superfície em camadas sucessivas e concêntricas. De facto, estas células são mobilizados para formar um autêntico tecido de isolamento e/ou sequestração do corpo estranho. Os plasmatócitos tomam uma forma achatada, tornam-se mutuamente adesivos e formam um verdadeiro tecido com fusão de membranas e o estabelecimento de junções íntimas e de desmossomas entre as várias camadas de células (Brehélin *et al.*, 1975; Brehélin e Duvic, 1999). O encapsulamento não está associado à indução da expressão dos genes dos metabolitos antimicrobianos (Nicolas *et al.*, 1996). Por conseguinte, a aniquilação do corpo estranho ocorre, então, pelo seu isolamento num invólucro constituído por numerosas camadas de células, estanques e internamente melanizadas, que contribuem para a eliminação dos agentes

bióticos por sufocação metabólica ou acção tóxica (Nappi *et al.*, 1995; Strand e Pech, 1995; Gateff, 1994; Watson *et al.*, 1994), mediada também pelas enzimas lisossomais, lisozima, actividade peroxidásica e/ou oxigénio reactivo (Horton e Ratcliffe, 1993). A cápsula, em geral, encontra-se aderente ao tegumento interno da cutícula e a sua eliminação final dar-se-á após digestão lisossomal.

Está, ainda, descrito um outro processo de encapsulamento designado por humoral, estando a sua abordagem feita por Götz, (1986) e Vey, (1993) e a sua relação funcional está mais próxima dos mecanismos de melanização abaixo referidos.

## **4.2. As Reacções de Defesa Humoral**

Tradicionalmente as reacções de defesa humoral incluem a melanização, a coagulação e factores solúveis no plasma como as lectinas e a hemolina. Na verdade, porém, estas componentes do sistema de defesa dos insectos participam activamente nas reacções de defesa celular, a melanização ocorre nas cápsulas e nódulos, a coagulação é o primeiro passo da formação de nódulos, enquanto que as lectinas e a hemolina só têm sentido porque participam e permitem o reconhecimento e a fixação dos corpos estranhos aos hemócitos.

### **4.2.1. Melanização**

Os efeitos da melanização devida à actividade das fenoloxidasas foram descritos há cerca de 60 anos por Bodine e Allen (1941). As enzimas fenoloxidase ou tirosinase (monofenol L-DOPA oxirredutase: EC 1.14.18.1) contêm cobre e possuem uma distribuição muito ampla no seio do mundo vivo, desde os procariótas e eucariótas onde se inclui o Homem. Estas enzimas ou grupo de enzimas foram caracterizadas como sendo responsáveis por duas das mais importantes reacções que conduzem à síntese do pigmento negro, denominado melanina, ou sejam, a oxigenação e a hidroxilação dos monofenóis em *o*-difenois e

a oxidação dos *o*-difenois nas correspondentes quinonas necessárias para a sua síntese (Mason, 1955; Nappi e Sugumaran, 1993; Sugumaran e Kanost, 1993). A fenoloxidase é considerada como sendo uma importante proteína envolvida nos mecanismos de defesa imunitária dos artrópodes, designadamente, dos insectos. Com efeito, as enzimas do tipo tirosinase ou fenoloxidase (PO) desempenham uma função muito relevante tanto na cicatrização de feridas provocadas por agentes entomopatogénicos, parasitas ou parasitóides como nos processos de formação de nódulos e/ou cápsulas de sequestração destes agentes invasores (Ashida e Brey, 1998). Esta enzima na sua forma de zimogénio ou proenzima inactiva, denominada profenoloxidase (PPO), é convertida em enzima activa, após contacto com peptidoglicanos, em cujo reconhecimento intervém uma proteína opsonizante presente na hemolinfa (Yoshida *et al.*, 1996; Ochiai e Ashida, 1999), LPS bacterianos e  $\beta$ -glucanos fúngicos (Saul e Sugumaran, 1987; Brehélin *et al.*, 1989; Cherqui *et al.*, 1998; Brehélin e Duvic, 1999; Ashida, 1971; Ashida e Brey, 1998), pela via de uma cascata proteolítica específica da responsabilidade de um conjunto de serina proteases, que se encontra fisiologicamente bem controlada e regulada por inibidores específicos das proteases da cascata (Brehélin *et al.*, 1991; Boigegrain *et al.*, 1992; Sugumaran e Kanost, 1993; Andersson *et al.*, 1989). A PPO encontra-se presente em vários tecidos dos insectos, designadamente, i) nos tecidos integumentares do insecto, onde é um importante elemento da esclerotização (Ashida e Brey, 1998; Asano e Ashida, 2001 a,b), ii) na hemolinfa (Asano e Ashida, 2001a,b; Cherqui *et al.*, 1996), iii) associada à membrana dos hemócitos (Charalambidis *et al.*, 1996a,b) e/ou iv) sintetizada e secretada pelos hemócitos (Brehélin *et al.*, 1989). Porém, qualquer que seja a localização do zimogénio, após a sua activação, é transportada para a cutícula ou sintetizada nas células do integumento e depositada em redor das feridas cuticulares (Asano e Ashida, 2001 a,b) ou sobre os agentes estranhos em fase de nodulação ou encapsulamento (Söderhäll *et al.*, 1996; Sugumaran, 1996; Bidochka *et al.*, 1997; Ashida e Brey 1998).

A função da PO na melanização dos nódulos ou das cápsulas, assim como, nas acções de cicatrização, conferiu-lhe o estatuto de proteína imune. A sua acção tem merecido um enorme esforço da comunidade científica no sentido de esclarecer os mecanismos da sua activação e da sua regulação (Satoh *et al.*, 1999;

Kim *et al.*, 2000; Ma e Kanost, 2000; Werner *et al.*, 2000; Danielli *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Nagai e Kawabata, 2000), principalmente, porque a melanização e/ou encapsulamento pode conduzir à ineficácia de certas espécies ou estirpes de *Plasmodium* sp. em colonizar o mosquito *Anopheles gambiae* (Jiang *et al.*, 1998; Ahmed, *et al.*, 1999; Dimopoulos *et al.*, 1997).

Existem excelentes artigos de revisão sobre esta matéria, não só relacionada com os insectos mas também com outros artrópodes, cuja consulta se aconselha para informações adicionais e perspectiva histórica sobre este domínio de investigação (Horton e Ratcliffe, 1993; Nappi e Sugumaran, 1993; Söderhäll e Aspan, 1993; Söderhäll e Smith, 1986; Johansson e Söderhäll, 1996).

#### 4.2.2. Coagulação

Sob o ponto de vista evolutivo tanto os invertebrados como os vertebrados, desenvolveram mecanismos moleculares muito eficientes na formação de coágulos sanguíneos que impedem, por exemplo, a perda deste fluido vital aquando de ferimentos, actuando em prol da manutenção da homeostasia. Os vertebrados possuem em comum um sistema de coagulação semelhante baseado na agregação proteolítica do fibrinogénio solúvel em fibrina insolúvel (Doolittle, 1984 a,b; Furie e Furie, 1988).

De um modo muito semelhante ao da (pro)fenoloxidase (PPO), nos insectos, assim como, noutros artrópodes, a coagulação da hemolinfa representa um mecanismo muito eficiente de defesa imunitária. Além disto, nos crustáceos, existe uma relação funcional com os mecanismos da via da cascata proteolítica que conduz à melanização (Durliat, 1991; Srimal, 1996; Hall *et al.*, 1999; Nagai e Kawabata, 2000), é possível que nos insectos a relação funcional entre a coagulação e a activação da cascata profenoloxidásica também seja um facto (Brehélin e Boemare, 1988; Brehélin *et al.*, 1989; Duvic e Brehélin, 1998; Brehélin e Duvic, 1999; Muta *et al.*, 1996).

Nos insectos estão bem identificados dois tipos de mecanismos de coagulação. O primeiro diz respeito ao sistema descrito para *Leucophaea*

*moderata* (Barwig, 1985; Bohn, 1986; Barwig e Bohn, 1980; Bohn e Barwig, 1994) e o segundo para *Locusta migratoria* (Brehélin, 1971, 1972, 1979 a,b). No essencial estes dois sistemas são muito semelhantes e os argumentos experimentais apontam para que a lipoforina e o coagulogénio tenham uma identidade molecular muito próxima (Bohn, 1986). Com efeito, existem duas proteínas de coagulação, o coagulogénio hemocitário e o coagulogénio hemolinfático. A formação do coágulo requer a participação de ambas as moléculas porque nunca ocorre o fenómeno se não existir a participação do coagulogénio hemocitário (Brehélin, 1979). A lipoforina ou coagulogénio plasmático de *L. moderata* é um complexo lipoproteico constituído por uma fracção proteica da qual fazem duas proteínas de 320 kDa e 76 kDa. Por seu lado, o coagulogénio de *L. migratoria* é um complexo lipoglicoproteico constituído por duas outras proteínas de 260 kDa e 85 kDa (Bohn, 1986; Duvic e Brehélin, 1998; Brehélin e Duvic, 1999). A activação deste sistema é da responsabilidade dos LPS bacterianos e dos  $\beta$ -glucanos fúngicos (Duvic e Brehélin, 1998; Brehélin e Duvic, 1999) e a sua principal função é a de reter e imobilizar os agentes microbianos patogénicos num coágulo, limitando-lhes a mobilidade para além do local de entrada, de modo a que a disseminação na cavidade geral não ocorra permitindo que a sua destruição possa ser realizada com êxito. Além disto, as proteínas do coagulogénio hemolinfático ou plasmático não deixam activar a cascata da profenoloxidase pelo que, o desencadear do mecanismo de coagulação, permite a subsequente entrada em funcionamento daquele outro sistema de defesa (Duvic e Brehélin, 1998). Acresce que as proteínas plasmáticas diminuem consideravelmente a aderência dos hemócitos sem a qual é impossível ou muito difícil a formação de cápsulas (Coodin e Caveney 1992). Pode concluir-se, a partir destes resultados, que a transformação do plasma em soro, ou coagulação, é uma condição prévia para que seja possível o desencadear outros processos de defesa nos insectos (Brehélin e Duvic, 1999).

Relembre-se, a propósito, o que foi referido acima sobre a nodulação e melanização: em presença de invasores os granulócitos são activados desgranulando ou secretando o seu conteúdo vesicular constituído, entre outras moléculas, por coagulogénio hemocitário. A interacção do coagulogénio hemocitário com o plasmático provoca a coagulação localizada da hemolinfa.

Acresce que a precipitação das proteínas do coagulogénio plasmático permite o desencadear dos mecanismos de aderência dos hemócitos e de activação da cascata proteolítica da profenoloxidase.

### 4.2.3. Lectinas

As lectinas são proteínas específicas com afinidade para o reconhecimento de carboidratos que, nos animais, estão implicadas num vasto número de mecanismos de reconhecimento e ligação a resíduos glucídicos variados de entre os quais se destacam os fenómenos de interacção hóspede-patógeno, de encaminhamento intracelular de proteínas, de interacção e adesão celular (Elgavish e Shaanan, 1997), de renovação de glicoproteínas séricas e participação nos fenómenos de resposta imunitária inata (Vijayan e Chandra, 1999).

As lectinas animais não apresentam a assombrosa diversidade recombinante dos anticorpos. No entanto, os numerosos estudos bioquímicos elaborados sobre a especificidade de reconhecimento dos carboidratos, assim como, a análise estrutural dos locais de ligação das lectinas, sugerem que a limitada diversidade nas propriedades de reconhecimento era suplantada pela presença de múltiplas lectinas com distintos epitopos específicos. Neste sentido, as lectinas apresentam-se como candidatas à função de moléculas de reconhecimento que permitem, aos animais desprovidos de mecanismos de resposta imunitária adaptativa, reconhecer um vasto leque de carboidratos estruturalmente diferentes (Vasta, *et al.*, 1994, 1996 e 1999).

O número dos trabalhos sobre a participação das lectinas nas reacções de defesa interna dos insectos tem vindo a aumentar nos últimos anos e começa a existir uma boa fonte de referências bibliográficas sobre esta matéria. Assim, numerosas lectinas têm sido purificadas da hemolinfa de vários insectos (Marchalonis e Edelman, 1968; Hammarstrom e Kabat, 1969; Yeaton, 1981; Umetsu *et al.*, 1984; Giga *et al.*, 1985; Ravindranath *et al.*, 1985; Muramoto e Kamiya, 1986; Kubo e Natori, 1987; Kubo *et al.*, 1990; Drif e Brehélin, 1994) e, apesar de nem todas estarem caracterizadas sob o ponto de vista das suas

funções biológicas, a evidência experimental sugere a que participam nos mecanismos de reconhecimento e de defesa contra a invasão de organismos patogénicos (Amanai *et al.*, 1990; Pendland e Boucias, 1986; Komano, 1991; Komano e Natori, 1985; Lackie, 1980, 1981 e 1986; Jomori e Natori, 1992 a,b; Kawasaki *et al.*, 1993; Kotani *et al.*, 1995), designadamente, na opsonização e consequente eliminação de agentes microbianos (Pendland *et al.*, 1988, Drif e Brehélin, 1989; Richards e Ratcliffe, 1990; Jomori e Natori, 1992 a,b; McKenzie e Preston, 1992a,b,c; Wheeler *et al.*, 1993; Kawasaki *et al.*, 1993) à semelhança dos fenómenos que acontecem nos mamíferos (Kuhlman *et al.*, 1989; Cooper *et al.*, 1994; Tino e Wright, 1996; Matsushita *et al.*, 1996).

#### 4.2.4. Hemolina

Tem sido demonstrado que existem na hemolinfa dos insectos, além das lectinas, outros factores solúveis específicos para o reconhecimento dos LPS ou glucanos e consequente activação das defesas humorais e celulares. Os hemócitos, principalmente, os granulócitos (Wang *et al.*, 1995) e os corpos gordos de *H. cecropia* secretam uma proteína, tanto em culturas *in vitro* como *in vivo* (Trenczek e Faye, 1988), a qual foi chamada hemolina. Esta molécula reconhece os LPS, por intermédio do Lípido A (Daffre e Faye, 1997), ligando-se à superfície das bactérias e, também, dos hemócitos, constituindo um factor de opsonização que participa na formação de um complexo proteico que, ao que tudo indica, é iniciador da fagocitose (Andersson e Steiner, 1987; Sun *et al.*, 1990; Su *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1995; Zhao e Kanost, 1996). O complexo proteico opsonizante origina alterações na adesividade dos hemócitos (Bettencourt, 1999; Bettencourt *et al.*, 1999) e modifica os padrões das fosforilações intracelulares pela activação das vias de sinalização envolvendo as proteínas cinases C e as proteínas da fosforilação da tirosina (Lanz-Mendoza *et al.*, 1996; Faye e Kanost, 1997).

O aumento das evidências experimentais sugerem que a hemolina possui funções tanto ao nível do reconhecimento imune como participa nos fenómenos de adesão celular. Esta molécula é ainda regulada ao longo as fases do desenvolvimento dos insectos tal como é sugerido pelas alterações da sua

concentração durante a ecdise larval e pupal (Trenczek, 1998; Lanz-Mendoza e Faye, 1999).

#### 4.2.5. Péptidos antimicrobianos

Os insectos lutam contra infecções bacterianas, em parte, através da produção e circulação extracelular de uma variedade de pequenos péptidos antibacterianos, que actuam como antibióticos bacterianos e/ou fúngicos e como desinfectantes. Embora mais de 400 péptidos diferentes, característicos da resposta imune inata, tenham sido identificados nos eucariótas a maior parte dos insectos produz pouco mais do que 10 classes destes péptidos (Bulet *et al.*, 1999; Hoffmann, 1995; Hoffmann *et al.*, 1996, 1999; Ferrandon *et al.*, 2000; Hoffmann e Reichhart, 2002).

Nos insectos a resposta imunitária humoral às infecções bacterianas é a rápida síntese de novo de uma bateria de diversos péptidos antimicrobianos (Boman, 1995, 1996; Boman *et al.*, 1987; Kaaya, 1993; Hetru *et al.*, 1998; Götz e Trenczek, 1991; Chadwick e Aston, 1991), que são ocorrem e/ou são sintetizados em numerosos tecidos, nomeadamente, nos corpos gordos (Faye e Wyatt, 1980; Dunn e Drake, 1983; Dunn, 1986; Boman e Hultmark, 1987; Sondergard, 1993), nos hemócitos (Zachary e Hoffmann, 1984; Boman, 1991; Jinhua *et al.*, 1995), nas células epiteliais cuticulares (Brey *et al.*, 1993), nas células do epitélio intestinal (Daffre *et al.*, 1994; Lehane *et al.*, 1997; Russell e Dunn, 1996), nas glândulas salivares (Kylsten *et al.*, 1992), no complexo pericárdico (Russell e Dunn 1990) e no tracto reprodutor (Samakovlis *et al.*, 1991; Rosetto *et al.*, 1996) e a sua expressão pode ser constitutiva, induzível ou ambas (Boman, 1998; Meister *et al.*, 1997; Diamond e Bevins, 1998; Lehrer e Ganz, 1999; Ganz e Lehrer, 1998).

Apesar da diversidade estrutural que estes péptidos representam, existe uma característica comum a todos eles que é a sua anfipatia, a qual é um indicador do modo de acção molecular. Com efeito, estes péptidos actuam ao nível das membranas e das paredes celulares matando os seus alvos biológicos pela via

da lise celular (Cociancich *et al.*, 1993 a,b; Lockey e Ourth, 1996) ou atacando os componentes do invólucro parietal bacteriano (Morishima *et al.*, 1995).

A activação dos genes que, nos insectos, participam nas reacções de defesa humoral inata encontra-se muito bem documentada em vários artigos, nomeadamente, Hultmark (1993), Meister *et al.* (1997), Engström (1998), Ghosh *et al.* (1998), Zhang e Ghosh (2001), Ferrandon *et al.* (2000), Silverman e Maniatis (2001), Hoffmann (1995), Hoffmann e Reichhart (2002), Bulet *et al.* (1999) e Hoffmann *et al.* (1999). De resto, estes artigos consubstanciam a melhor e a mais actualizada documentação científica sobre tão vastos assuntos, como os abordados nesta secção, sendo a sua consulta vivamente aconselhada para demais esclarecimentos e aprofundamento desta matéria.

O que ressalta conclusivamente do exposto neste estudo bibliográfico, sobre o sistema imunitário dos insectos, é que os vários mecanismos e fenómenos bioquímico-metabólicos não funcionam por si só e estabelecem uma rede de interacções que permitem responder com muita eficácia às invasões patogénicas. Contudo, agentes microbianos entomopatogénicos existem que são capazes de contornar, evitar, inibir ou destruir a complexa e variada maquinaria de defesa imunitária dos insectos.

O objectivo do presente trabalho é o de contribuir para elucidar como é que o complexo nematobacteriano estudado e, muito particularmente, a bactéria simbiote, participa no sucesso do fenómeno entomopatogénico em que está envolvida.