

CAPÍTULO 4

Estudo da actividade α -Xlis sobre os hemócitos de insectos e as hemácias de carneiro

4.1. Natureza dos vacúolos formados pela α -Xlis

Os resultados obtidos, relacionados com os efeitos da actividade α -Xlis sobre os hemócitos de insectos, são semelhantes e consistentes com o descrito anteriormente para a actividade do tipo C1. De facto, as observações permitiram constatar que as fracções cromatográficas da filtração em gel e da fase reversa eram citolíticas em presença de hemócitos de insectos e de hemácias de carneiro, sendo responsáveis por elevados índices de mortalidade celular. A quantidade de células mortas aumentava consoante a concentração da amostra e ao tempo de duração da incubação. A especificidade celular continuou a observar-se sendo os granulócitos as células mais sensíveis. Em microscopia óptica uma das alterações mais evidentes era a da vacuolização celular característica primeiramente nos granulócitos secundada pelos plasmatócitos.

De facto, o principal efeito observado sobre os hemócitos é o de uma lise importante destas células. Contudo, quando se utilizaram doses mais fracas da citotoxina ou tempos de incubação mais curtos, observou-se uma importante vacuolização dos hemócitos. Existem poucas toxinas bacterianas conhecidas que provocam uma vacuolização das suas células alvo mas, desde que o efeito se

produz, trata-se sempre de uma vacuolização induzida ao nível do compartimento endossomal das células.

Em face do exposto, decidiu-se testar esta hipótese e, para isso, efectuaram-se dois tipos de estudos. Num primeiro tempo, foi elaborada a verificação se, de facto, pertenciam ao compartimento endossomal os vacúolos produzidos pela α -Xlis. Para tal, ensaiou-se uma coloração específica deste compartimento com vermelho neutro. Num segundo tempo, o estudo em microscopia electrónica permitiu determinar exactamente qual o compartimento citoplásmico envolvido na vacuolização induzida pela α -Xlis.

4.1.1. Coloração pelo vermelho neutro

Os hemócitos incubados durante um curto espaço de tempo, entre 15 e 30 min (Material e Métodos; 2.1.11. e 5.2.2.), em presença da α -Xlis apresentaram-se vacuolizados e foram de seguida corados pelo vermelho neutro. A intensidade desta coloração parece não ser consistente com a hipótese de que a α -Xlis é responsável pelo aparecimento de vacúolos de origem endossomal nos hemócitos dos insectos estudados.

De facto, a coloração embora um pouco mais intensa (Fig. 25) não é significativamente diferente em relação às células testemunhas que não foram expostas à citotoxina. Acresce que, a observação directa ao microscópio óptico, corroborou este tipo de resultados porque os hemócitos testemunha apresentaram um grau de coloração pelo vermelho neutro muito semelhante ao dos hemócitos que estiveram em contacto com a α -Xlis, apesar de estes últimos se encontrarem um pouco mais vacuolizados. Com efeito, o que parece ser um aumento do volume vacuolar é um facto evidente nas células expostas à α -Xlis mas, a concomitante coloração, parece não acompanhar e corresponder à esperada confirmação da hipótese de trabalho formulada.

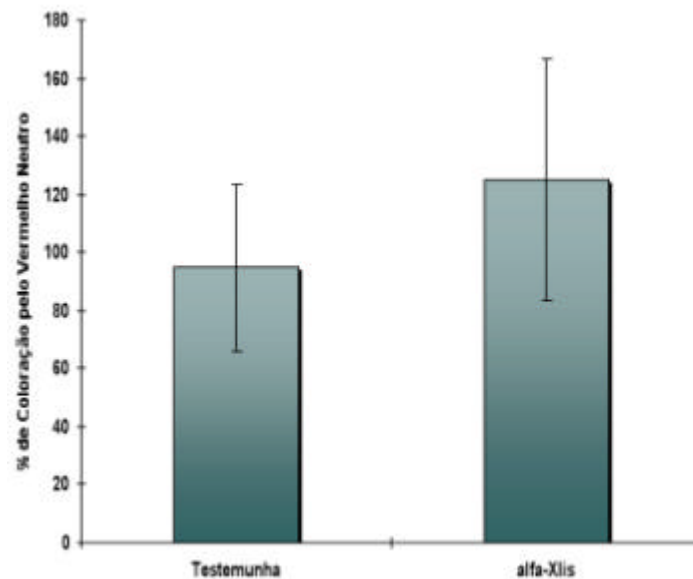


Fig. 25 – Coloração pelo vermelho neutro dos hemócitos testemunha e sujeitos à ação da α -Xlis. De notar que os hemócitos tratados com a citotoxina apresentam um ligeiro aumento na retenção vacuolar do vermelho neutro. No entanto, apesar do valor médio ser superior, a diferença entre os dois valores não é significativamente diferente, (Média \pm desvio padrão; n=10)

Em presença de uma eventual contradição, aumento do compartimento vacuolar sem a correspondente e significativa tomada do vermelho neutro pelas células, concluí-se que, no caso da α -Xlis, o fenómeno de vacuolização observado parece não ser devido a um aumento do volume do compartimento endossomal/vacuolar. Para investigar mais precisa e pormenorizadamente este fenómeno recorreu-se à microscopia electrónica.

4.1.2. Estudo em microscopia electrónica

O exame das células em microscopia electrónica de transmissão permitiu observar e encontrar a solução para a aparente contradição dos resultados enunciada anteriormente. De facto, foi observado um numeroso conjunto de amostras hemocitárias que incubaram com várias concentrações de α -Xlis e a tempos diferentes. Tornou-se evidente que a vacuolização observada em

microscopia óptica, não era devida ao aumento do volume vacuolar ou ao aumento individual do número de vacúolos de origem endossomal. Na realidade, este acréscimo de volume do tipo vacuolar era devido à distensão das membranas em consequência da dilatação do lúmen das cisternas do retículo endoplásmico e do espaço perinuclear. O fenómeno da dilatação luminal do sistema endomembranar era bem evidente nos granulócitos e estava na origem do aparecimento enormes vesículas, (Fig. 26B). Nos plasmatócitos, contudo, apesar de também serem dilatações vesiculares do retículo, o fenómeno era mais retardado do que nos granulócitos e não era tão pronunciado.

Apesar de tudo as células em contacto com doses mais elevadas de α -Xlis (1/2 até 1/4) apresentavam-se maioritariamente vacuolizadas chegando mesmo a colapsar, por rebentamento, como o provam os numerosos restos celulares que profusamente se observam. O mecanismo que conduziu à lise celular, por aumento consecutivo do volume luminal do sistema endomembranar, fez surgir a hipótese de que estariam envolvidos processos de alteração da permeabilidade celular e de acção colóide-osmótica.

A título de exemplo comparativo, efectuou-se igualmente um estudo em microscopia electrónica dos hemócitos após incubação em presença da actividade responsável pelo efeito C2 presente no meio de cultura da bactéria. As observações em microscopia electrónica de transmissão corroboraram as de microscopia óptica e revelaram que os diferentes tipos de hemócitos apareciam igualmente como células plasmolisadas de citoplasma densificado, com a cromatina nuclear condensada em massas arredondadas, com as mitocôndrias túrgidas mas com as cisternas e vesículas do RER apresentando um aspecto normal (Fig. 26 C).

A favor da hipótese colóide-osmótica concorrem as imagens obtidas em microscopia electrónica de varrimento (Fig. 27 e 28). Como facilmente se pode constatar algumas células, designadamente, os granulócitos, apresentam-se rebentadas a partir de 15 min de incubação com a α -Xlis, (Fig. 27 A-C). Note-se que os plasmatócitos não estão perfeitamente aderentes à superfície de contacto

iniciando-se a sua lise após 30 min de incubação (Fig. 27 B-D). Nesta altura os granulócitos são menos numerosos porque, à medida que entram em lise, perdem a adesividade e destacam-se da superfície da lamela. A Fig. 28 mostra o aspecto das células decorrida uma hora de incubação. A maioria das células são plasmatócitos encontrando-se lisados com a membrana rebentada. Nestes casos, o conteúdo celular tem tendência a sair para o exterior e povoar o campo de observação com numerosos restos celulares (Fig. 28 C-D). Aliás, este facto já tinha sido relatado aquando das observações em microscopia óptica.

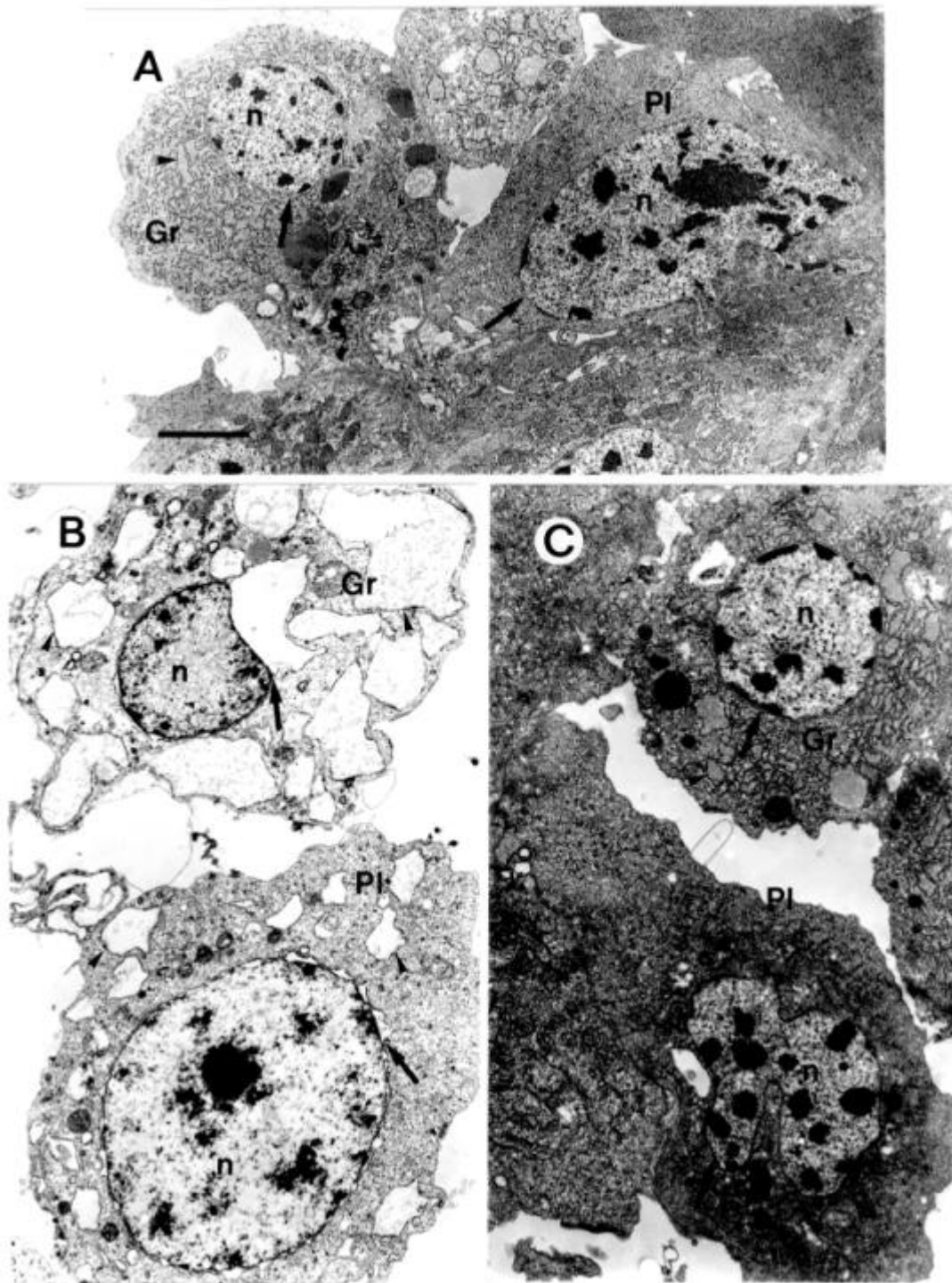


Fig. 26 - Aspecto, em microscopia electrónica de transmissão, de granulócitos e plasmatócitos de *S. littoralis* após 1h de incubação com os extractos citolíticos de *X. nematophila* F1/1 (n=núcleo; ponta de seta=vesícula do RER; seta=cisterna perinuclear; Barra=1,5 μ m). (A) hemócitos testemunha incubados em LB estéril; (B) extracto com actividade C1 diluído 1/3 em PBS (v/v). De notar a dilatação dos perfis do RER e da cisterna perinuclear; (C)) extracto com actividade C2 diluído 1/3 em PBS (v/v). De notar que as células se apresentam plasmolisadas com o citoplasma muito denso. A cromatina está condensada em massas arredondadas, em especial, nos plasmatócitos

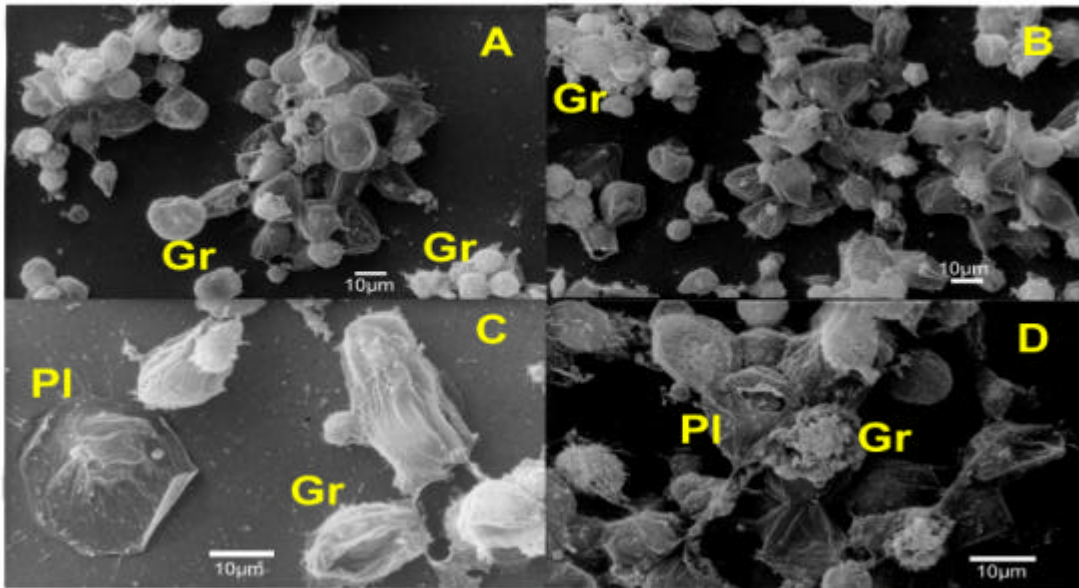


Fig. 27 - Imagens em microscopia electrónica de varrimento das monocamadas de hemócitos incubadas com α -Xlis: 15 min em AB e 30 min em BD. A lise dos granulócitos está bem evidente logo nos primeiros momentos de incubação apresentando-se maioritariamente rebentados, com o conteúdo celular a sair, a partir de 30 min de contacto com a toxina.

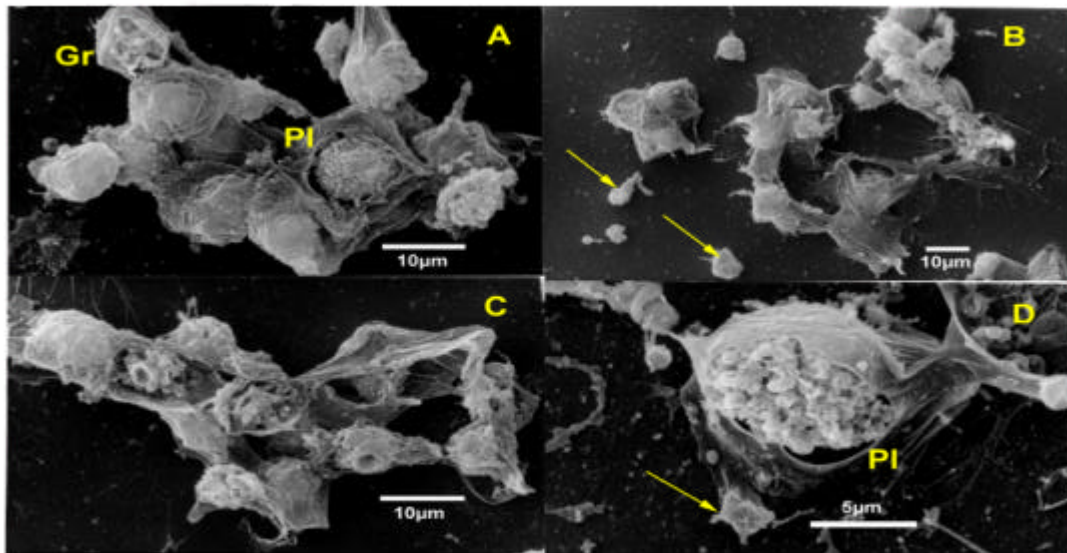


Fig. 28 - Imagens em microscopia electrónica de varrimento das monocamadas de hemócitos incubadas com α -Xlis durante uma hora. A lise dos células está perfeitamente documentada e parece ser evidente a confirmação da hipótese colóide-osmótica. As setas designam os restos de células que povoam as lamelas.

4.1.3. Conclusão

Contrariamente à enorme quantidade de toxinas bacterianas conhecidas a α -Xlis não provoca a dilatação ou a formação de novas vesículas endossomais/vacuolares mas é responsável por uma importante dilatação das vesículas e/ou cisternas do retículo endoplásmico. Existe uma outra toxina bacteriana que provoca um fenómeno semelhante nas células alvo. Trata-se da aerolisina produzida por *Aeromonas hydrophila*.

As citotoxinas bacterianas apresentam actividades biológicas que podem ser agrupadas em três grandes categorias: i) actividade enzimática; ii) actividade detergente e iii) actividade formadora de poros. Nesta etapa do trabalho tornou-se evidente que era importante verificar a qual destas categorias é que a actividade da α -Xlis pertencia, designadamente, se não seria responsável por aquele terceiro tipo de actividade.

Para controlar esta hipótese, tiveram de ser evidenciadas as diferentes características do mecanismo de acção da citotoxina e, logo de imediato, foi necessário evidenciar que a α -Xlis apresentava uma actividade sobre a membrana celular. Foi, também, importante assegurar que, após uma primeira acção sobre a membrana, a molécula responsável pelo efeito não era reciclada como o seria se a actividade fosse do tipo enzimática ou detergente.

4.2. A α -Xlis actua sobre a membrana celular e não é reciclada

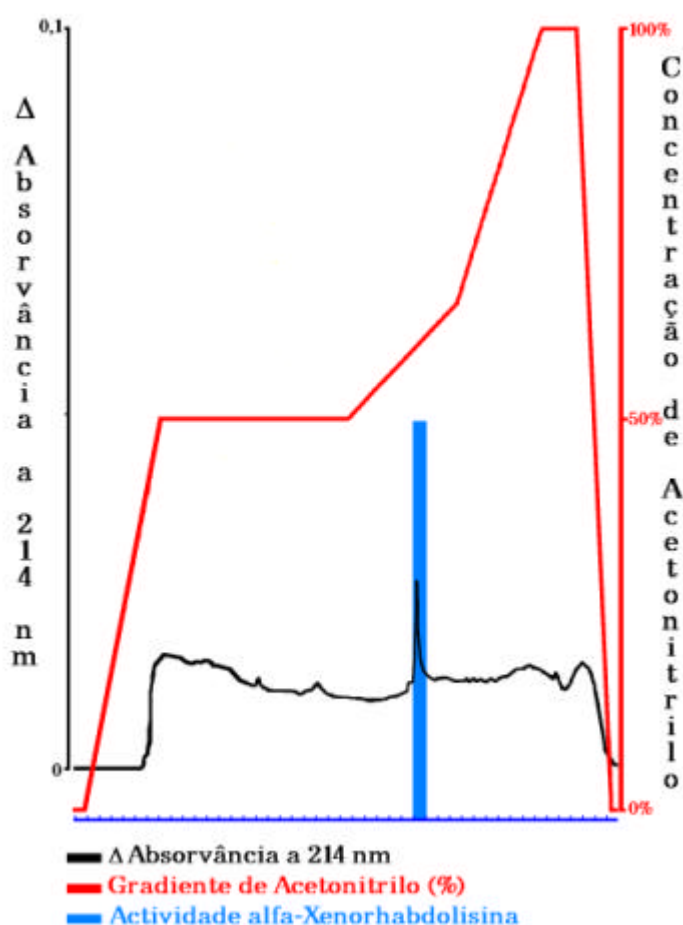
Os resultados de algumas observações esporádicas e não sistemáticas pareceram que indicavam esta possibilidade. Dentro desta óptica efectuaram-se três grandes tipos de experiências para se poder confirmar a hipótese.

4.2.1. A α -Xlis actua sobre as membranas das células

Os resultados mostraram inequivocamente que o efeito hemolítico sobre hemácias de carneiro e o efeito citolítico sobre hemócitos de insectos era devido a uma única e mesma molécula, a α -Xlis.

Nesta primeira série de experiências produziram-se fantasmas de hemácias de carneiro e de coelho (Material e Métodos, 5.4; 5.4.1. e 5.4.2.). Fez-se incubar estas membranas com uma solução de α -Xlis durante uma hora. No final desta incubação a suspensão de membranas foi centrifugada e, nos termos do protocolo, uma alíquota foi incubada com hemácias de carneiro e outra alíquota com hemócitos de insecto. Na segunda série de experiências, como testemunha utilizaram-se alíquotas das soluções de α -Xlis que não incubaram com as membranas das hemácias e que foram postas em contacto com hemócitos e com hemácias permitindo conhecer o título das actividades citotóxicas e hemolíticas da solução utilizada.

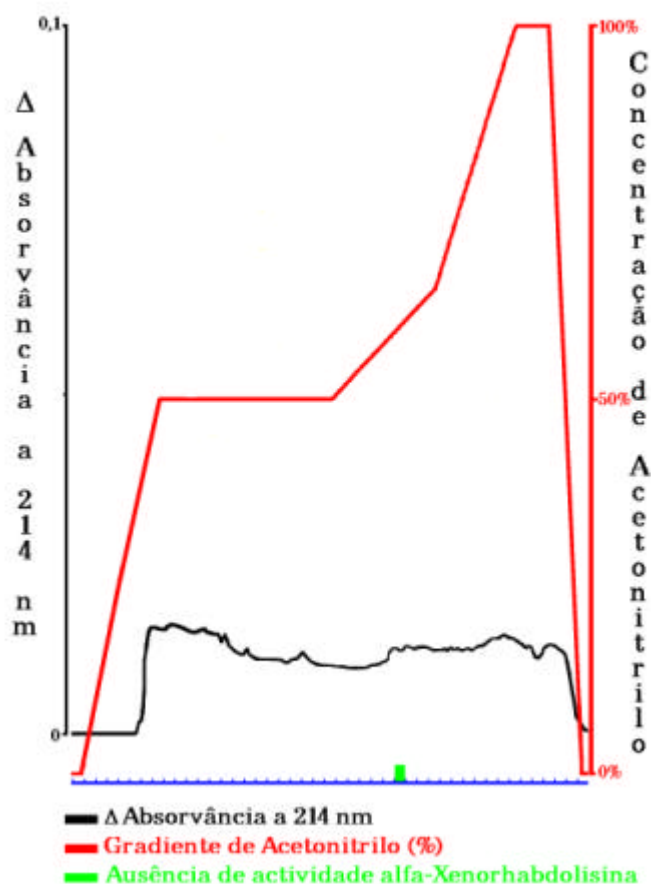
Os resultados mostraram que, no seguimento da incubação com as membranas de hemácias de carneiro, as actividades hemolítica e citotóxica se perdiam. Por seu lado, após a incubação da α -Xlis com as membranas das hemácias de coelho, as actividades biológicas eram totalmente reencontradas no sobrenadante da centrifugação. Este resultado constituiu um argumento suplementar para afirmar que a hemólise e a citotoxicidade eram produzidas por uma mesma molécula. Mas os resultados mostraram, sobretudo, que a α -Xlis se fixou sobre as membranas das hemácias de carneiro e que não se fixou sobre as membranas das hemácias de coelho corroborando o resultado de especificidade celular já anteriormente obtido. A fixação, sobre um determinado tipo de membranas, fez com que a actividade citotóxica se perdesse o que parece mostrar que a molécula não pode ser reciclada.



Cromatograma 9 – Perfil da cromatografia de uma alíquota da fracção citotóxica/hemolítica obtida na cromatografia de filtração em gel (TSK 3000) acidificada com 900 μ L de acetonitrilo/0,1% de ácido trifluoracético (ACT/TFA). A actividade α -Xlis está presente no pico assinalado a azul. A fracção activa elui a 61% de acetonitrilo (ACN) com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). A barra azul representa a actividade hemolítica da α -Xlis à qual correspondem 0,5 UHA contra hemácias de carneiro e \pm 60% de mortalidade contra hemócitos de *S. littoralis*. A linha preta representa a absorvância obtida no comprimento de onda de 214 nm e a vermelha o gradiente de ACN/TFA.

Além de todos estes resultados efectuámos um ensaio em que, no seguimento da incubação de uma alíquota de α -Xlis com membranas de hemácias de carneiro, processámos o sobrenadante em cromatografia de fase reversa em sistema HPLC (Cromatograma 10). O resultado foi o desaparecimento do pico com a actividade citotóxica. O perfil da cromatografia de uma alíquota da mesma solução de α -Xlis, mas que não foi incubada com as membranas, serviu de

testemunha e apresentou um pico onde se recuperou a actividade hemolítica contra hemácias de carneiro e hemócitos de insectos, (Cromatograma 9).



Cromatograma 10 – Perfil da cromatografia de uma alíquota da fracção citotóxica/hemolítica obtida na cromatografia de filtração em gel (TSK 3000). Esta alíquota foi previamente incubada com membranas de hemácias de carneiro e, como consequência, o pico com a actividade α -Xlis já não está presente. No final não se obteve actividade biológica. A fracção activa deveria ter eluído a 61% de acetonitrilo (ACN) com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) mas tal não aconteceu. Note-se a ausência do pico cromatográfico que, na cromatografia anterior, correspondia à actividade α -Xenorhabdolisina. A linha preta representa a absorvância obtida no comprimento de onda de 210 nm e a vermelha o gradiente de ACN/TFA.

Finalmente, para verificar esta possibilidade executou-se a terceira e última bateria de ensaios, na qual se desenvolveram duas novas experiências. Na primeira série de ensaios incubou-se a α -Xlis com crescentes concentrações

hemácias de carneiro e na segunda foi colocada em presença de hemácias de carneiro durante diferentes lapsos de tempo.

4.2.2. A actividade hemolítica não é proporcional à duração da incubação

As soluções de α -Xlis com diferentes concentrações foram incubadas entre 30 min e 24 h com hemácias de carneiro. A Fig. 29 mostra bem que a actividade hemolítica aumenta no início mas que, após duas horas de incubação, se estabiliza e mantém-se com o mesmo valor qualquer que seja a duração ulterior da incubação.

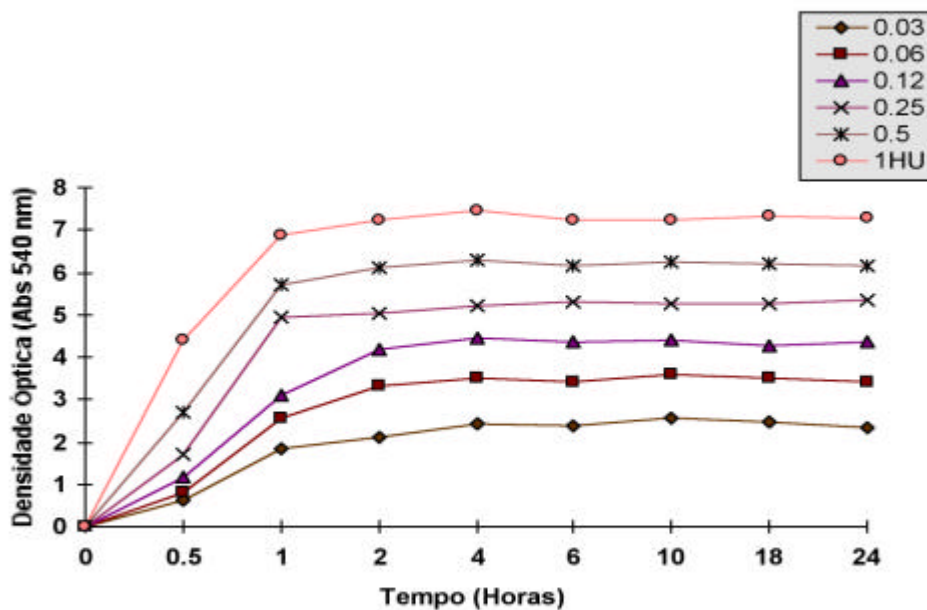


Fig. 29 – A actividade hemolítica não é proporcional à duração da incubação. Este Gráfico representa a acção hemolítica de diferentes concentrações de α -Xlis ao longo do tempo. Nota-se muito bem que, para qualquer concentração da toxina, o essencial da sua actividade está atingido após duas horas de incubação com as hemácias e que não se observa aumento da hemólise com o tempo de incubação por mais longo que ele seja. Tal resultado é um indicador claro de que a α -Xlis não é reciclada, ou seja, que a sua actividade não é do tipo enzimática.

Este resultado indica claramente que a α -Xlis não é reciclável, ou seja, que a sua actividade não é do tipo enzimática ou detergente. Uma das experiências clássicas que permitem afirmar que uma toxina é do tipo formadora de poros, consiste em fazer incubar uma determinada concentração de toxina com quantidades crescentes de hemácias (Rowe e Welch, 1994). Em consequência a próxima experiência foi elaborada para testar esta hipótese.

4.2.3. A percentagem de lise diminui com o aumento da concentração de hemácias

As duas doses diferentes de citotoxina incubaram durante duas horas com três concentrações crescentes de hemácias de carneiro. Os resultados expressos na Fig. 30 mostram que a actividade hemolítica, expressa em percentagem, diminui com o aumento da concentração de hemácias. Este resultado constitui um fortíssimo argumento para afirmar que, após a sua acção sobre a membrana de uma determinada célula alvo, a α -Xlis já não pode agir num segundo momento ou local. As moléculas de α -Xlis não podem ser recicladas e este facto constitui uma das características fundamentais das toxinas com actividade formadora de poros.

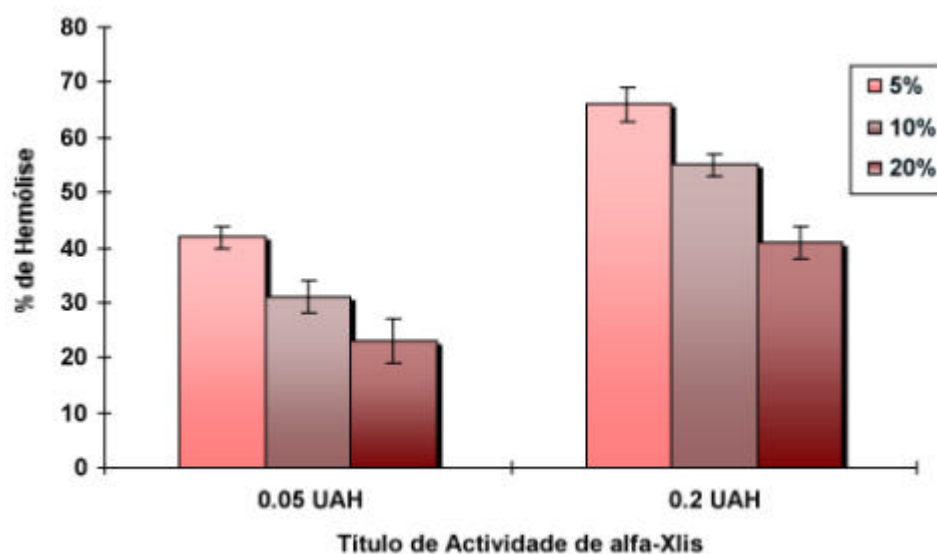


Fig. 30 - A percentagem de hemólise diminui com o aumento da concentração das hemácias. Observa-se claramente que, para dois títulos diferentes de α -Xlis, a percentagem de hemólise é mais fraca com o aumento da concentração de hemácias. Este é um indicador seguro para afirmar que a molécula não é reciclável porque, quanto maior o número de células alvo menor a percentagem de hemólise por defeito de moléculas disponíveis para efectuar a lise celular, (Média \pm desvio padrão; n=10).

4.2.4. Importância da temperatura na fixação da α -Xlis sobre a membrana

As toxinas celulares formadoras de poros exercem a sua actividade em duas etapas. No decurso da primeira etapa as moléculas da toxina fixam-se sobre a membrana celular das células alvo e, na segunda etapa, inicia-se a formação de canais pela polimerização de várias das suas moléculas entre si. Na maioria dos casos, a primeira etapa não carece de consumo de energia para que ocorra e, em consequência, pode efectuar-se à temperatura de 4°C. A polimerização, por seu lado, necessita de energia. A velocidade a que polimerização se processa aumenta com a temperatura e apresenta um óptimo nitidamente superior a 4°C.

Na primeira série de experiências constatou-se que os tubos inicialmente colocados às temperaturas de 4°C e 10°C não apresentavam hemólise enquanto que o colocado a 15°C foi titulado a 0,4 UHA, ou seja, cerca de metade da actividade da solução inicial. Nas incubações às temperaturas superiores

recuperou-se toda a actividade hemolítica inicial. Quando, o segundo conjunto reaccional de tubos colocados às diferentes temperaturas, foram colocados e incubados durante 1 h à temperatura de 37°C, verificou-se a total recuperação da actividade hemolítica inicial. Com estes ensaios confirmou-se a dependência da actividade hemolítica em relação à temperatura. Faltava caracterizar o tipo dessa dependência e, para isso, desenvolveram-se outros ensaios.

Nesta nova série de experiências testou-se a importância da temperatura sobre a hemólise de hemácias de carneiro do seguinte modo: as células foram incubadas em dois tempos. Num primeiro tempo o conjunto hemácias-toxina foi incubado a 4°C durante uma hora e depois centrifugado. O sobrenadante foi retirado nas mesmas condições de temperatura. De seguida o precipitado foi ressuspenso em tampão PBS desprovido de toxina e a incubação desenrolou-se à temperatura de 37°C durante uma hora. Por seu turno, o sobrenadante foi incubado, nas mesmas condições, com uma nova suspensão de hemácias. Os resultados deste ensaio estão expressos na Fig. 31 e, facilmente, se constata que eles mostram que é necessária uma temperatura compatível com a fisiologia celular normal para que ocorra a fixação da α -Xlis sobre as membranas. A 4°C a toxina não consegue fixar-se sobre as membranas. Por conseguinte ela permanece presente e activa no sobrenadante. Neste capítulo, a título de comparação, existe uma diferença entre esta actividade e a denominada do tipo C2 em que a fixação da molécula às membranas se processa a 4°C.

Para se poder afirmar, contudo, que a α -Xlis é verdadeiramente uma toxina formadora de poros é necessário demonstrar que um dos primeiros efeitos do seu modo de acção é uma modificação da permeabilidade da membrana celular. Esta abordagem experimental foi realizada de dois modos diferentes. A primeira aproximação constou da medida espectrofotométrica das entradas e saídas de cálcio e potássio. A segunda, repousou sobre a análise fina das perturbações da permeabilidade iónica que foi efectuada por intermédio das técnicas de electrofisiologia ou “patch-clamp”.

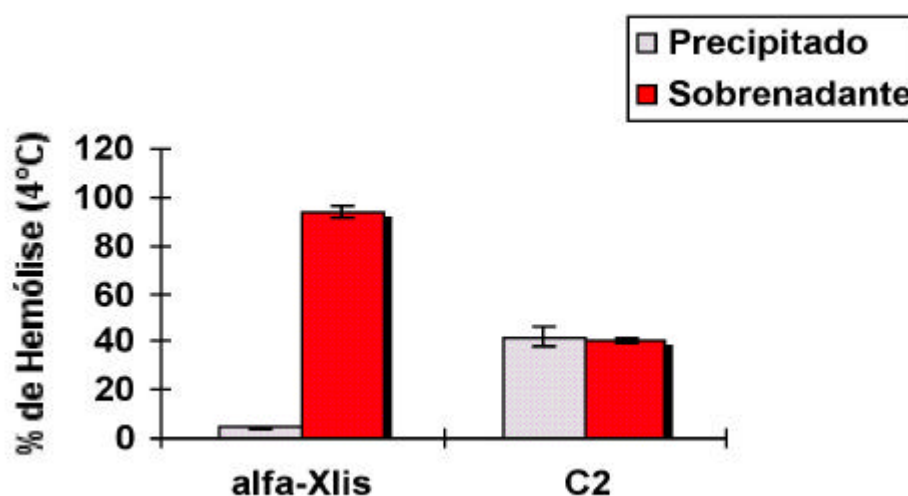


Fig. 31 - Importância da temperatura na fixação da α -Xlis sobre a membrana. Quando se incubam as hemácias de carneiro em presença de α -Xlis a 4°C não ocorre fixação da molécula sobre as membranas celulares. Este facto é revelado pela recuperação de toda a actividade hemolítica no sobrenadante depois de retiradas as hemácias por centrifugação. A barra mais clara representa o resultado da segunda incubação das células em PBS, já na ausência de α -Xlis, onde não ocorreu a hemólise, ou seja, a molécula não se fixou à membrana das células a 4°C. Por seu turno, o sobrenadante guardou toda a sua actividade dado que foi capaz de induzir a hemólise numa segunda incubação com novas hemácias. De notar, o diferente comportamento da molécula com actividade C2. Com efeito, a 4°C ocorre fixação da molécula sobre as membranas das hemácias de coelho. Na segunda incubação das células centrifugadas, repostas em suspensão em PBS, ocorre a hemólise, enquanto que, o sobrenadante respectivo guarda ainda cerca de metade da actividade inicial.

4.3. Modificações induzidas da permeabilidade iónica

4.3.1. Movimentos dos iões cálcio

4.3.1.1. Medida sobre uma população de hemócitos

À medida que doses cada vez mais importantes de α -Xlis eram adicionadas às monocamadas de hemócitos observou-se (Fig. 32 C) que a entrada de cálcio no

interior das células não se fazia progressivamente mas o seu fluxo era, ao contrário, brusco e ocorria após um tempo de latência que se seguia à introdução a toxina no sistema. Este era tanto mais curto ($\pm 150-200$ s) quanto a dose de toxina era elevada. De igual modo, a intensidade da reacção, cuja quantificação traduz o número de células atingidas pela entrada de cálcio, também aumenta com a dose de α -Xlis aplicada.

Com estes ensaios investigou-se quando é que as modificações, mediadas pela toxina sobre a permeabilidade membranar, poderiam resultar numa alteração da concentração do cálcio intracelular ($=[\text{Ca}^{2+}]_i$). Para este propósito as células pré-carregadas com Fura-2 foram expostas a concentrações crescentes de toxina (Fig. 32 C). Na concentração de 1/4, registou-se um rápido e transiente aumento na concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o qual foi aparentemente regulado rapidamente pela célula. Com efeito, nestas condições notou-se um rápido aumento da concentração intracelular do cálcio ao que se seguiu um decréscimo dessa mesma concentração nos momentos que se lhe seguiram (Fig. 32C).

As concentrações de toxina mais baixas entre 1/16 a 1/32 conduziram a um aumento intracelular do cálcio dependente da dose de toxina usada. A acção da toxina, em todas estas concentrações, conduziram à morte celular. Como testemunha os registos foram feitos com a concentração da toxina a 1/4 e sem a adição de cálcio no meio extracelular de modo a caracterizar as modificações transientes deste catião observadas anteriormente. O resultado não poderia ter sido mais elucidativo: a esta concentração, a toxina medeia um ligeiro aumento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de um modo muito semelhante àquele que se observa quando a activação é feita pela estimulação de receptores, associados à libertação do cálcio armazenado internamente, tal como acontece com a via do inositol trisfosfato (IP3). De facto, na ausência de cálcio externo e em presença da toxina, observou-se um pequeno aumento do cálcio intercelular, o qual deve ter sido proveniente da sua libertação a partir das reservas intracelulares (Fig. 32 C). Este facto, sugere que a indução do aumento da concentração de cálcio pela α -Xlis resulta do influxo do meio exterior deste catião.

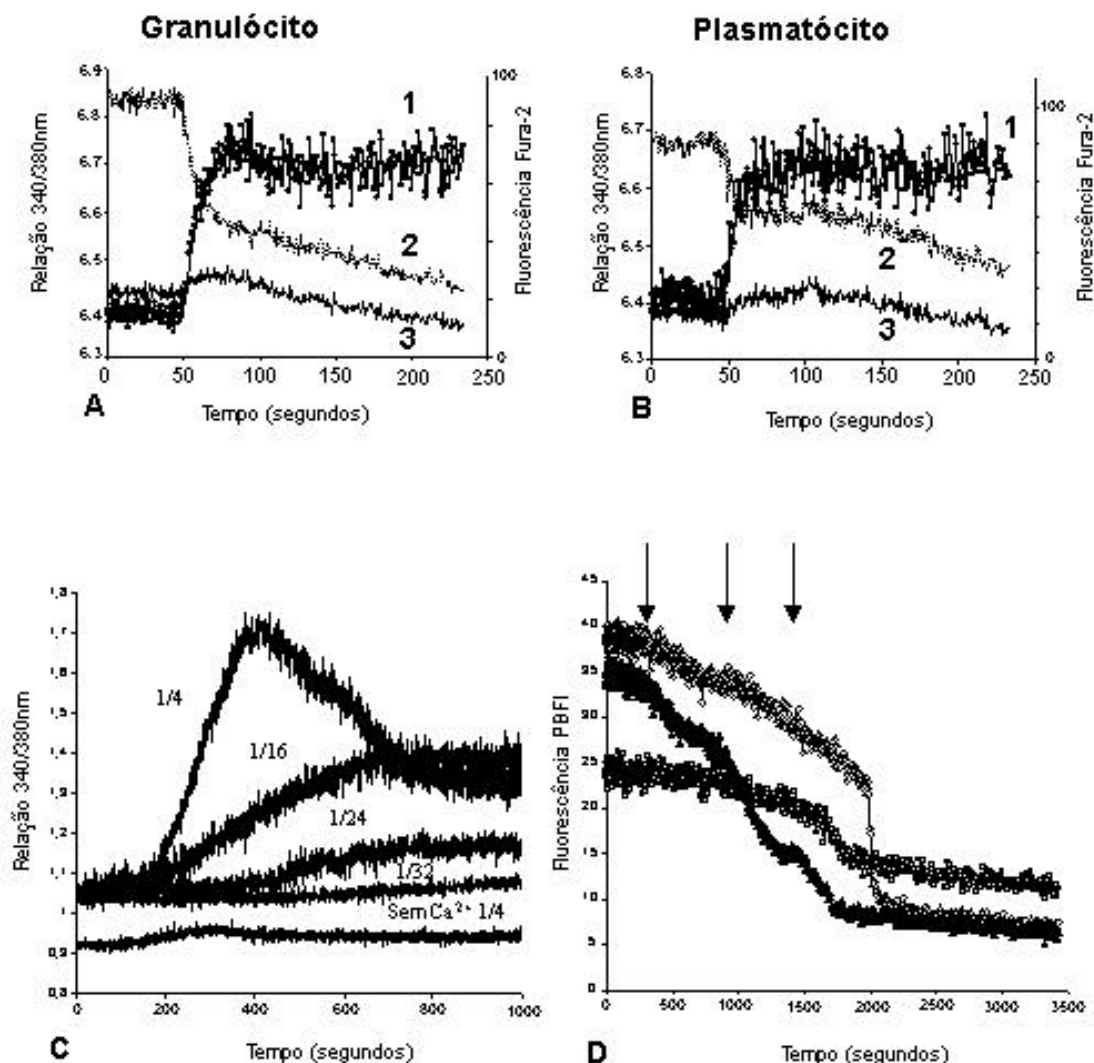


Fig. 32 – Movimentos dos íons cálcio e potássio. Medição da concentração do cálcio citossólico livre numa população de hemócitos e em células individuais, (A, B e C) e do potássio em células individuais, (D). Dada a complexidade da legenda solicita-se, a título excepcional, o acompanhamento a partir da leitura do texto.

4.3.1.2. Medida sobre células isoladas

Neste ensaio, de uma população heterogénea de hemócitos presentes nas monocamadas e de resultados indicaram um valor que reflectia a medida do aumento do número total de células atingidas pelo fenómeno observado, passou-se para a observação diferencial desse mesmo fenómeno. Nesta

experiência a entrada de cálcio em cada um dos tipos de células imunocompetentes foi medida. A Fig. 32 A e B, mostra que qualquer que seja o tipo de hemócito, granulócitos ou plasmatócitos, respectivamente, a entrada de cálcio não se faz lentamente e, de novo, se observa que ela ocorre de um modo brusco após 50 s de tempo de latência inicial. No momento da entrada brusca de cálcio a célula aparece imediatamente com sinais de lise. Além disto, após este duplo fenómeno, entrada brusca de cálcio e de lise celular, observa-se, seguidamente, uma saída lenta e progressiva do cálcio intracelular do interior de cada uma das células analisadas (Fig. 32 A e B; curvas 2 e 3).

Quanto aos registos apresentados na Fig. 32 A e B relativos aos granulócitos e plasmatócitos, respectivamente, o que é que poderá explicar, então, a forma que a curva da variação do cálcio apresenta? A atenta observação das emissões do Fura-2 a 510 nm (curvas 1), obtidas na relação das excitações a 340/380 nm, indicam que apesar do aumento inicial da fluorescência existiu efectivamente um aumento do $[Ca^{2+}]_i$, mas que as emissões do Fura-2 depois seguem uma direcção oposta diminuindo (curvas 2 e 3). A segunda parte da curva ou regulação desta variação transiente, reflecte certamente uma diluição do Fura-2 no meio. De facto, quando se atinge o máximo da razão entre os comprimentos de onda de excitação (curvas 1), as emissões do Fura-2 tendem a mostrar uma diminuição (Fig. 32 A e B; curvas 2 e 3). A explicação mais plausível é a de que a toxina induz o rompimento da membrana celular motivando a saída do Fura-2 para o meio exterior. Deste modo, a α -Xlis é capaz de induzir a morte celular na ausência do cálcio externo, podendo ser postulado que o aumento do cálcio detectado aquando da exposição das células à toxina não está correlacionado com a sua toxicidade e, certamente, reflecte a lise celular.

4.3.1.3. Conclusão

Estes resultados mostram claramente que a α -Xlis não modifica a permeabilidade membranaar sustentada do cálcio. O aumento do cálcio

intracelular só se faz quando a célula se lisa. Ou seja, a medida da entrada deste íon na célula não provoca a lise celular mas é uma consequência dessa lise. De resto, esta interpretação é inequivocamente corroborada pelos resultados espectrofotométricos e pelas observações em microscopia óptica, dado quando se opera o aumento da fluorescência da relação 340/380 nm (curva 1) se assiste à imediata turgescência e vacuolização da célula em análise e, muitas vezes, até mesmo ao seu rebentamento

4.3.2. Movimentos dos íões potássio

Com a mesma técnica efectuou-se a medição da perda de potássio pelas células por acção da α -Xlis. Para esta análise, foram acrescentadas doses cada vez mais importantes da toxina sobre as monocamadas de hemócitos e as medidas foram efectuadas célula a célula, (granulócitos).

4.3.2.1. Resultado do movimento dos íões potássio em registos sobre uma população de hemócitos

A Fig. 32 D mostra que a cada adicionamento de α -Xlis (flechas) produziu uma fuga de potássio em cada uma das três células analisadas. Depois, cada uma delas conseguiu controlar homeostaticamente essa fuga e o nível do íon retornou a um nível mais ou menos estável até à próxima junção de toxina. Ao fim de três adições de toxina, as células já não conseguem controlar a perturbação provocada pela presença da α -Xlis e acabam por lisar. Este fenómeno traduz-se por uma queda importante e brusca do potássio intracelular. No momento da queda brusca do potássio intracelular as células, observadas ao microscópio óptico, apresentam-se túrgidas, bastante vacuolizadas e, por vezes, também se assiste ao seu rebentamento puro e simples.

4.3.2.2. Conclusão

Contrariamente ao cálcio, a α -Xlis provoca perturbações na permeabilidade membranar ao potássio que não são consequências da lise celular. Foi, portanto, conveniente estudar detalhadamente este tipo de modificações para aferir com rigor quantos e quais os iões envolvidos nas modificações da permeabilidade celular das membranas dos hemócitos. Para tal efectuaram-se estudos electrofisiológicos mais pormenorizados.

4.4. Estudo electrofisiológico e modificações da permeabilidade celular aos iões potássio em células individuais

Os estudos electrofisiológicos, nas configurações de contacto hermético do tipo “inside-out” e “on-cell” dos hemócitos conduziram a resultados muito interessantes no que concerne as alterações da permeabilidade celular em presença de α -Xlis.

4.4.1. Configuração sobre a membrana da célula aderente “on cell”

Numa primeira tentativa para estudar as modificações induzidas pela toxina, foram ensaiados registos convencionais de “patch-clamp” na configuração células inteiras (whole-cell) sobre granulócitos identificados individualmente nas monocamadas de hemócitos. Os registos foram tentados somente nos primeiros sessenta minutos após a adesão celular às lamelas. No entanto, os registos electrofisiológicos estáveis, na configuração célula inteira, foram quase sempre impossíveis de obter a partir dos granulócitos. Com efeito, estas células reagem quase imediatamente, ao contacto hermético e à abertura da membrana na zona intraelectrodo, resselando a abertura na membrana que permitia o acesso ao

estudo nesta configuração. Por sua vez e contrastando com esta atitude, os plasmatócitos davam fácil acesso aos registos na configuração célula inteira. Esta discrepância entre estes dois tipos células pode ser atribuída a propriedades específicas das suas membranas. De facto, os granulócitos possuem uma membrana celular rugosa com invaginações e filipodia enquanto que os plasmatócitos possuem uma membrana celular lisa permitindo um acesso mais fácil do microeléctrodo. Esta foi a principal razão pela qual os registos na configuração sobre a membrana da célula aderente foram preferidos aos registos na configuração célula inteira. Além do mais, de modo a examinar a actividade formadora de poros da α -Xlis e para evitar uma fastidiosa e incontrolada exposição das células à toxina, a α -Xlis foi aplicada directamente no interior da pipeta porta-eléctrodo de registo. Para este propósito, uma certa quantidade da toxina foi diluída no meio interno da pipeta porta-eléctrodo e, de acordo com a técnica descrita e desenvolvida por Akaike e Harata (1994), as modificações induzidas pela toxina puderam ser registadas. De referir que a concentração de 1/16 foi a escolhida porque, além de possuir uma boa actividade citolítica permitia o contacto hermético estável. Com efeito, na presença de concentrações mais elevadas de toxina não era possível estabelecer contactos herméticos estáveis entre o eléctrodo e a membrana.

Num primeiro tempo a análise electrofisiológica incidiu sobre o comportamento dos hemócitos, particularmente, dos granulócitos, em presença da solução Krebs-PBS intra-pipeta porta-eléctrodo, ou seja, com a preservação dos gradientes iónicos isosmóticos e na configuração “on-cell”. Nestas condições, notou-se que os registos não mostravam qualquer variação da corrente como resposta aos diferentes potenciais de manutenção que foram sendo induzidos, (Fig. 33 A). Este resultado sugere que estas células não possuem canais cuja abertura esteja dependente da voltagem. O que não quer dizer, porém, que os granulócitos não possuem quaisquer outros tipos de canais iónicos na sua membrana celular. De referir que nos registos efectuados com os plasmatócitos os resultados foram idênticos, ou seja, não se detectou a existência de canais dependentes da voltagem, (resultados não apresentados).

Em segundo lugar, fizeram-se ensaios preliminares para conhecer as melhores condições de trabalho, designadamente, sobre a diluição a utilizar. Em consequência, foi encontrada a diluição de 1/16 da fracção purificada em tampão Krebs-PBS, por ter mostrado o melhor compromisso entre a facilidade para deixar efectuar contacto hermético, tempo de duração e qualidade dos registos das condutâncias celulares.

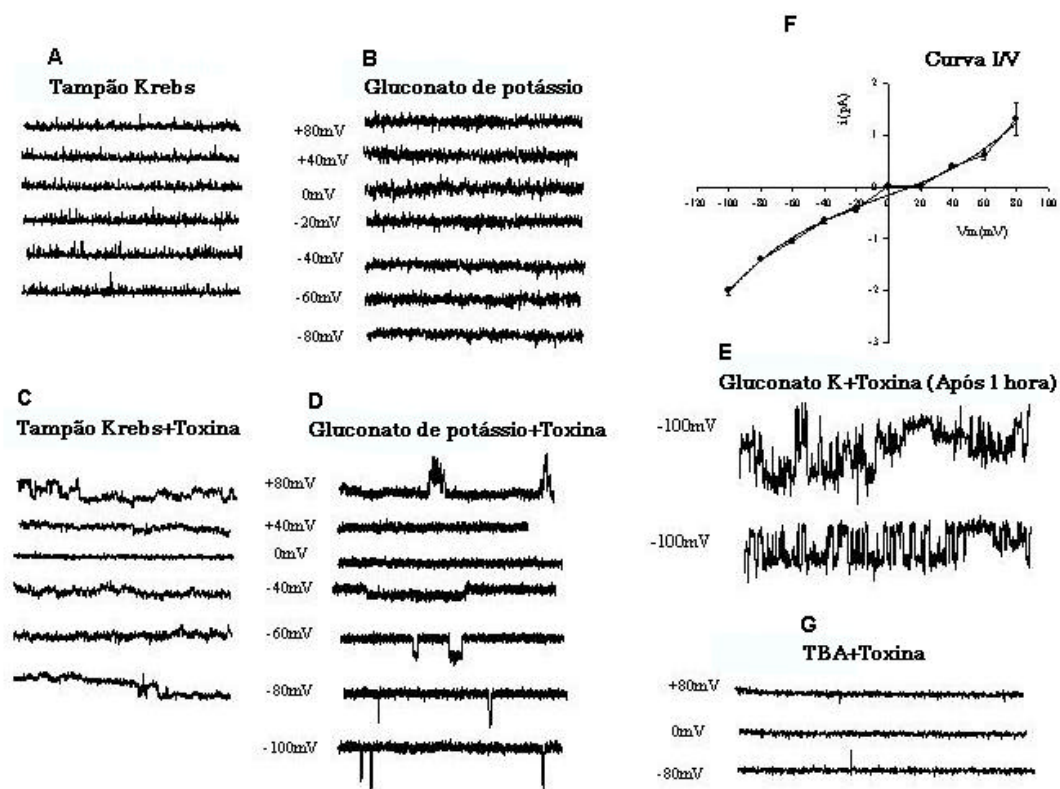


Fig. 33 - Estudo electrofisiológico e modificações da permeabilidade celular aos iões potássio e cloro na configuração “on cell” dos Granulócitos de *S. littoralis*. Em A e B os registos testemunha onde não se observam aberturas de canais dependentes da voltagem. Em C e D as células apresentam a abertura de canais onde se observam vários estados de condutância segundo a corrente de voltagem induzida. Em E constata-se que a abertura dos poros é mais prolongada com o tempo de incubação. Em F o Gráfico mostra a curva I/V em que se regista a inversão das condutâncias dependentes da corrente de voltagem. Em G observa-se a total inibição das condutâncias devido ao efeito bloqueador dos iões potássio pelo TBA. Os resultados obtidos para os Plasmatócitos são semelhantes aos apresentados para os Granulócitos.

Finalmente, executaram-se os ensaios em tampão Krebs na presença de α -Xlis e observaram-se as condutâncias ilustradas na Fig. 33 C. Notou-se que à

medida que se fez variar a corrente de voltagem se obtiveram vários estados de conductância com uma inversão nítida no potencial de 0 mV. Este resultado fez supor a hipótese de que a toxina é responsável pelo aparecimento de condutâncias que não tinham sido observadas nos ensaios testemunha. Esta acção poderá ficar a dever-se à estimulação de canais iónicos nativos ou à abertura de novos canais por intermédio da formação de poros, por exemplo. Apesar de tudo, as correntes observadas, ao inverterm-se junto de 0 mV, sugerem uma não selectividade iónica dos canais (Fig. 33 C). Com efeito, o tampão Krebs-PBS apresenta na sua composição vários iões que respondem às diferentes variações da corrente não permitindo obter condutâncias características e reveladoras dos iões susceptíveis de passarem pelos poros entretanto formados. No entanto, quando se alterou o programa de registo das condutâncias para registo das capacitâncias, o perfil então obtido permitiu inferir que se estava em presença do ião potássio, (resultados não apresentados). Em conformidade com este facto, os ensaios passaram a ser feitos em condições limitantes e controladas do número de iões presentes no tampão do eléctrodo afim de, com precisão, caracterizar a selectividade iónica e a conductância activada pela presença da α -Xlis. Para tanto, alterou-se o tampão do eléctrodo de Krebs-PBS para gluconato de potássio. Este tampão apresenta o seu principal ião, o potássio, numa concentração vizinha da concentração celular, por conseguinte, o potencial de equilíbrio é teoricamente muito próximo de 0 mV. Na ausência de α -Xlis verificou-se que não existia nenhuma corrente (Fig. 33 B) em conformidade com o que foi anteriormente evidenciado. Pelo contrário, em condições de presença de α -Xlis, observam-se a existência de correntes unitárias após um tempo de contacto de 15-20min, (Fig. 33 D).

Na presença da toxina, obtiveram-se registos de abertura de canais nos potenciais de membrana extremos, e.g. -80 e $+80$ mV. Não se detectaram correntes nos potenciais de membrana entre -20 e $+20$ mV. Este resultado indica que os iões podem fluir não selectivamente através dos poros formados na membrana pela α -Xlis à medida que os potenciais de membrana se aproximam e revertem a 0mV, (Fig. 33 C). Efectuou-se, também, o registo da inversão das

correntes unitárias por volta de 0 mV, (Fig. 33 F). No entanto, o efeito da toxina era dependente do tempo de incubação. De facto, após 20 min observaram-se aberturas de canais mais longas e registou-se o aparecimento de múltiplos estados de conductância antes que ocorresse a perda da selagem, facto que ocorreu sempre por volta de uma hora de incubação.

O conjunto destes resultados configura uma selectividade iónica dos canais induzidos pela toxina para os catiões potássio. No entanto, não é de excluir que existam outros iões envolvidos, designadamente, os seus respectivos contra aniões, ou seja, o cloro. Com efeito, uma observação similar tinha sido feita quando se substitui o meio intraeléctrodo por cloreto de potássio 150 mM. Nestas condições, constatou-se além da inversão de correntes de saída e de entrada de iões perto de 0mV também não existiam registos de movimentos iónicos. Este fenómeno poderia ser devido à compensação das condutâncias devida à passagem equilibrada dos iões potássio e cloro, as quais se poderiam anular mutuamente.

Para elucidar esta eventualidade, fizeram-se novos ensaios com as pipetas porta-eléctrodos cheios de soluções ricas em cloro. Assim, o passo seguinte consistiu em examinar a selectividade iónica dos poros formados pela α -Xlis.

De registar o facto de que os estudos electrofisiológicos efectuados permitiram concluir que os granulócitos são as células mais sensíveis quando comparadas com os plasmatócitos. No entanto, estes últimos hemócitos apresentam um comportamento idêntico aos primeiros.

4.4.2. Efeitos dos inibidores dos canais potássio (TEA, TBA)

Para inferir sobre a selectividade dos poros gerados pela α -Xlis utilizaram-se soluções à base de derivados de amónio, e.g. cloreto de tetraetilamónio e cloreto de tetrabutylamónio, conhecidos por serem bloqueadores convencionais das condutâncias potássicas. Nestas condições, não se registaram correntes, dado que, efectivamente, os derivados de amónio bloquearam as

condutâncias geradas pela abertura de poros pela α -Xlis. Acresce que, também, não se verificaram registos de condutâncias devidas ao cloro, podendo concluir-se que os poros formados pela α -Xlis não eram permeáveis a este anião (Fig. 33 G).

4.4.3. Configuração “inside-out”

Na configuração “inside-out” a membrana dos granulócitos foi destacada e o hemifolheto interno da mesma foi exposta à α -Xlis. O ensaio e os respectivos registos decorreram nos moldes descritos para a configuração “on-cell”. Os resultados não poderiam ter sido mais ilustrativos porque, para as mesmas concentrações de α -Xlis, comparados os resultados com os da configuração anterior, a abertura de canais foi muito mais rápida. Com efeito, a resposta foi quase sempre imediata à junção da toxina no meio.

Estes resultados estão de acordo e correlacionados com a possibilidade de existirem dois receptores lipídicos para esta toxina. Com efeito, em resultados não apresentados, entretanto obtidos decorrentes de estudos em curso, (ver a Discussão), constatou-se que existem dois fosfolípidos membranares que inibem a acção citolítica e hemolítica da α -Xlis. Tratam-se da fosfatidilserina e do fosfatidilinositol, fosfolípidos negativos, ambos constituintes do hemifolheto interno das membranas biológicas

Os resultados obtidos nos ensaios na configuração de célula aderente permitiram suspeitar que a toxina podia insinuar-se para o interior da célula e, uma vez no citoplasma, continuar a sua acção formadora de poros na membrana e/ou no sistema endomembranar. Para suporte destas hipóteses concorreram resultados a dois níveis: i) a célula “vacuoliza” por aumento do volume das cisternas do retículo endoplásmico e do espaço perinuclear. Este facto, poderá indicar uma acção indutora de alterações da permeabilidade, também, a este nível membranar; ii) o segundo resultado diz respeito à perda de capacitância celular (resultados não apresentados). Com efeito, quando se alterou o programa de registo das condutâncias para o de registo das capacitâncias, observou-se que

este último se perdia a partir de 45-60 min de contacto, entre a membrana celular e a pipeta porta eléctrodo repleta de uma solução contendo a toxina. Note-se o seguinte: as variações das condutâncias dizem respeito aos registos dos movimentos dos iões em resposta às variações da intensidade da voltagem do potencial de membrana. Estes movimentos iónicos ocorrem na zona membranar delimitada pelo diâmetro de contacto da pipeta porta eléctrodo. Quando se registaram as alterações na capacitância celular estes resultados indicaram que aconteceram aberturas de poros na superfície membranar externa ao diâmetro da pipeta. Um tal fenómeno só podia ter acontecido se tivesse havido difusão da toxina para o citoplasma e a continuação da sua acção formadora de poros, em áreas mais afastadas da membrana, a partir do interior da célula.

Neste contexto, examinou-se a eventual hipótese da selectividade da toxina em relação aos domínios membranares dos hemifolhetos externo e interno da membrana celular. O domínio do hemifolheto externo já tinha sido analisado, só faltava o exame do domínio interno das membrana celulares dos granulócitos. O ensaio que se delineou para este estudo foi o de efectuar os registos electrofisiológicos na configuração o interior da membrana celular exposto ao exterior, ou seja, em contacto com a toxina. A exposição do hemifolheto interno da membrana celular dos granulócitos a uma solução de α -Xlis (1/16) resultou na obtenção e registo de correntes que simbolizaram a entrada de grandes quantidades de iões potássio seguida de uma rápida perda do selo hermético. Este resultado indicou que a α -Xlis actua de ambos os lados da membrana celular dos granulócitos.

4.4.4. Conclusão

Os resultados das análises pela técnica do “patch-clamp” permitem afirmar que a α -Xlis provoca uma modificação da permeabilidade dos catiões monovalentes ao nível da membrana celular dos macrófagos de *S. littoralis*. Agora é necessário compreender como é que esta perturbação pode conduzir à lise

das células. A hipótese mais provável faz pensar que, no seguimento da abertura dos canais iónicos, ocorre um desequilíbrio da pressão osmótica. Com efeito, se os catiões monovalentes estão em equilíbrio de uma parte e de outra da membrana celular, os canais formados pela α -Xlis não permitirão a passagem das moléculas de maiores dimensões presentes no citoplasma. Este desequilíbrio da pressão osmótica provoca uma entrada em massa de água na célula a qual, por sua vez, conduz a uma turgescência e à consequente lise. Se esta hipótese é exacta, poder-se-ão realizar experiências ditas de "protecção osmótica" que, ao compensarem o aumento da pressão osmótica devida à acção da toxina, impedem a lise celular.

4.5. Experiências de protecção osmótica

O princípio destas experiências é o seguinte: adiciona-se ao meio de incubação das células, contendo a toxina, uma substância cujas moléculas são globulares e de tamanho suficientemente importante para impedir o seu atravessamento da membrana pela via dos poros formados pela toxina. A concentração desta substância está calculada para compensar a pressão osmótica devida às moléculas de grande dimensão presentes no citoplasma.

No seguimento da incubação entre as células e a toxina, os poros são formados pela α -Xlis mas não se observam alterações ou movimentos osmóticos importantes. Portanto, se a lise celular normal é devida aos movimentos de água, mesmo que os poros sejam formados pela toxina não observam nem turgescência ou lise celular. Além do mais, ao utilizar substâncias cujas moléculas apresentam tamanhos diferentes, pode ficar a conhecer-se a dimensão aproximada dos poros formados pela toxina.

4.5.1. Protecção osmótica da hemólise das hemácias de carneiro.

Os ensaios, cujos resultados estão reportados na Fig. 34 foram realizados com diferentes concentrações de α -Xlis. As substâncias servem para compensar a pressão osmótica ou que actuam como protectoras osmóticas são a sacarose e os polietilenoglicol 4000 e 6000.

Estes resultados mostram que a hemólise das hemácias provocada pela α -Xlis é devida a uma entrada de água nas células e de um desequilíbrio da pressão osmótica de um dos lados da membrana celular. Mas estes resultados mostram também outra coisa: observa-se, com efeito, que a protecção osmótica não se realiza pelas mesmas moléculas dos protectores em função da concentração da toxina. Na concentração mais fraca (diluição 1/100) os dois PEG protegem totalmente as hemácias e, até mesmo, a sacarose confere uma protecção a 50%. Na concentração média (diluição 1/10) somente os dois PEG impedem a hemólise. Na concentração mais forte de toxina, só o PEG 6000 protege bem as hemácias, o PEG 4000 só confere uma protecção a 40%. Isto significa que em função da concentração de toxina, a dimensão dos poros formados não é a mesma e é tão mais importante quanto a concentração de α -Xlis é mais elevada.

A continuação óbvia do estudo conduziu à pesquisa da eventual protecção osmótica dos hemócitos quando em presença do efeito citotóxico da α -Xlis.

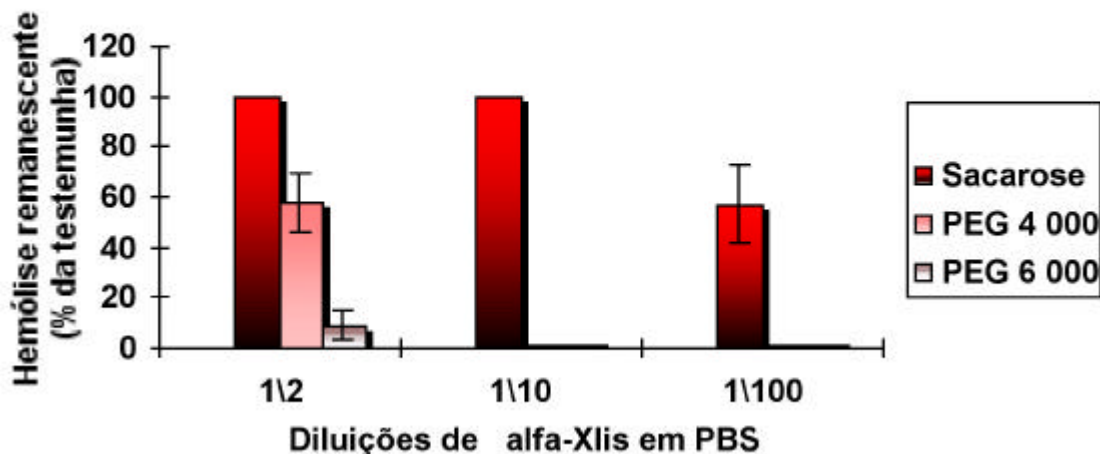


Fig. 34 - Protecção osmótica da hemólise das hemácias de carneiro. A protecção osmótica não se realiza pelas mesmas moléculas dos protectores em função da concentração da toxina. Na concentração mais fraca (diluição 1/100) os dois PEG protegem totalmente as hemácias e, até mesmo, a sacarose confere uma protecção a 50%. Na concentração média (diluição 1/10) somente os dois PEG impedem a hemólise. Na concentração mais forte de toxina, só o PEG 6000 protege bem as hemácias, o PEG 4000 só confere uma protecção a 40%. Isto significa que em função da concentração de toxina, a dimensão dos poros formados não é a mesma e é tão mais importante quanto a concentração de α -Xlis é mais elevada.

4.5.2. Protecção osmótica da lise de hemócitos

Neste estudo, foram utilizadas um maior número de diluições da α -Xlis e a rafinose e o dextran 1000 foram testados, para além, dos dois PEG e da sacarose. Os resultados estão reportados na Fig. 35.

De igual modo aos resultados obtidos para as hemácias observou-se também uma boa protecção osmótica dos hemócitos. Além do mais, esta protecção foi realizada por moléculas diferentes em função da concentração de α -Xlis, a dimensão molecular do protector eficaz aumenta com as concentrações crescentes da toxina.

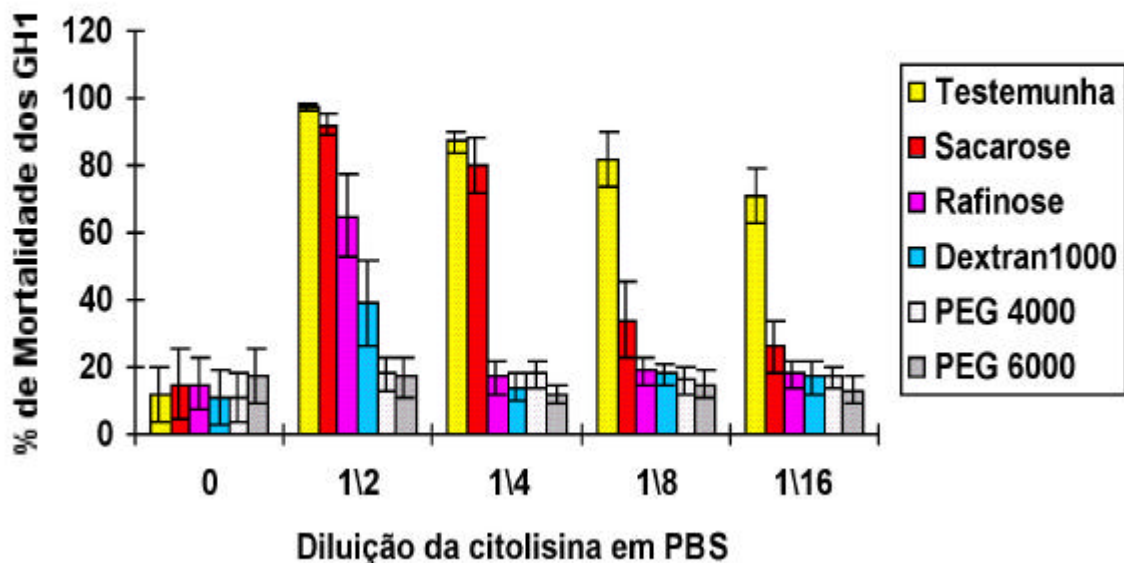


Fig. 35 - Protecção osmótica da lise de granulócitos de *S.littoralis*. O gráfico mostra que à medida que a concentração da toxina diminui a protecção conferida pelos diferentes agentes protectores aumenta. A testemunha é configurada com a dose de α -Xlis sem a presença do agente protector. Este facto está, também, relacionado com o diâmetro dos poros formados pela α -Xlis. Nas maiores concentrações de α -Xlis a quantidade de moléculas disponível é maior e o diâmetro dos poros também, ou seja, existe uma correlação directa entre a quantidade de toxina presente e o diâmetro dos poros.

A partir destas medidas podemos deduzir que o diâmetro dos poros formados pela α -Xlis varia de menos de 1 nm (poros catiónicos e protecção pela rafinose) até um máximo de 5,8 nm (protecção pelo PEG 6000).

O conjunto dos resultados obtidos nos ensaios de protecção osmótica mostram que tanto para a hemólise como para a citólise, a origem da lise celular parece ser devida a um desequilíbrio da pressão osmótica provocada pela α -Xlis. Neste caso, esperava-se que o facto de se retirar a molécula protectora se deveria poder restabelecer a lise das células. Em consequência nas experiências seguintes tentou-se verificar esta hipótese.

4.5.3. Restituição da lise celular após protecção osmótica

Estes ensaios consistem em retirar as moléculas que conferem a protecção osmótica no seguimento da incubação em presença da toxina e do protector e efectuar uma segunda incubação sem toxina nem protector. Se a toxina formou efectivamente poros, na sequência da primeira incubação, quando as perturbações da pressão osmótica deixarem de estar compensadas, no decorrer da segunda incubação, reencontrar-se-ão os movimentos osmóticos responsáveis pela produção da turgescência e a lise das células.

4.5.3.1. Caso da citólise de hemócitos.

Todas as monocamadas de hemócitos foram primeiramente incubadas em presença de uma molécula protectora (PEG 4000) ao que se seguiu a adição de uma dose de toxina para a qual o diâmetro dos poros formados é menor do que a dimensão do PEG 4000, (protecção efectiva da lise).

Nos termos do protocolo, em metade das preparações e no seguimento da primeira incubação (toxina + molécula protectora), efectuou-se a contagem do número de células lisadas e o respectivo cálculo da percentagem total da mortalidade hemocitária (coloração pelo azul Trypan). As preparações da outra metade foram lavadas cuidadosamente com PBS e incubadas por mais 15 min suplementares. No final desta segunda incubação a percentagem das células lisadas (coloração pelo azul Trypan) foi calculada e comparada com aquela obtida para as monocamadas testemunhas (as quais só incubaram em presença do PEG 4000). Neste caso observou-se uma percentagem de células lisadas muito superior àquela medida em presença da molécula protectora e totalmente comparável à lise obtida aquando dos hemócitos incubados com a toxina e sem protector (Fig.). Parece evidente que, neste caso, a ausência de lise, aquando da incubação com a toxina em presença de PEG 4000, foi devida a uma compensação da pressão osmótica pela molécula protectora.

4.5.3.2. Caso da hemólise das hemácias de carneiro

No seguimento da incubação das hemácias de carneiro com a toxina e as moléculas protectoras (PEG 4000 ou 6000), a suspensão foi centrifugada e o precipitado repostado em suspensão em PBS e incubado por 15 min suplementares. O sobrenadante foi utilizado para medir o título da hemólise que ocorreu aquando da primeira incubação.

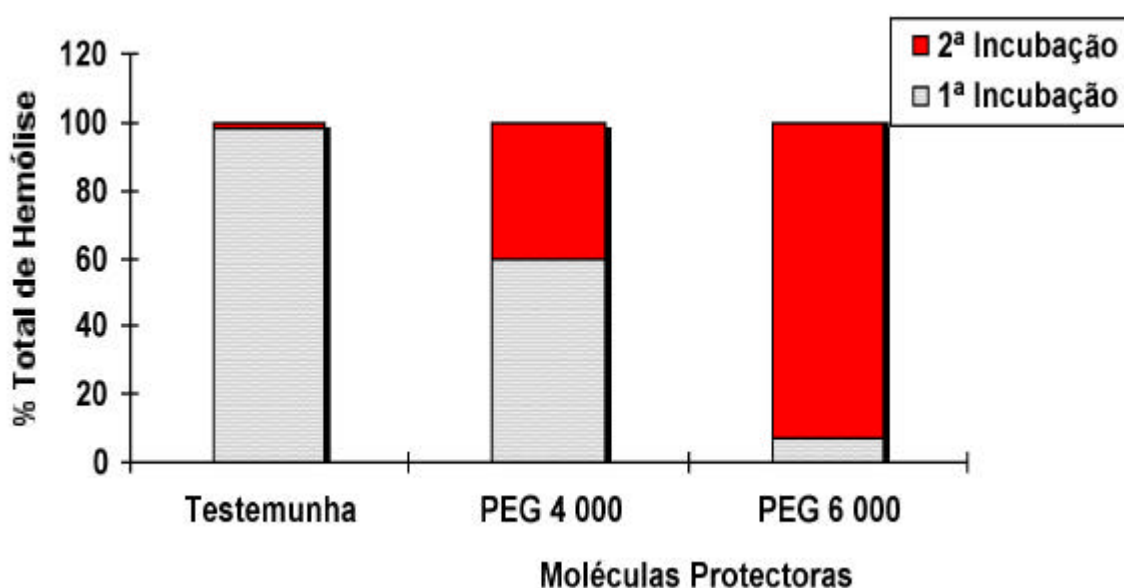


Fig. 36 - Restituição da hemólise das hemácias de carneiro após protecção osmótica. A barra vermelha representa a restauração da hemólise após a retirada do agente protector. Nota-se que, principalmente, no caso do PEG 6000 que a elevada protecção conferida por esta molécula foi abolida porque na segunda incubação as hemácias já não contaram com o agente que impediu a hemólise inicial.

Os resultados estão referidos na Fig. 36. Se não houve dúvida quanto ao elevado grau de protecção conferido às hemácias aquando da primeira incubação, sobretudo com o PEG 6000, a segunda incubação restaurou uma hemólise em tudo comparável àquela obtida com a mesma dose de toxina mas incubada em ausência das moléculas protectoras as quais configuraram o ensaio testemunha positiva. Na figura só está representada a testemunha negativa, ou seja, hemácias incubadas em tampão e na ausência de toxina.

4.5.4. Conclusão

A partir dos resultados expressos acima é possível afirmar que a lise dos hemócitos de insectos ou das hemácias de carneiro pela α -Xlis é devido a um único processo. O fenómeno de lise celular parece ser mediado por uma importante entrada de água nas células, osmose esta induzida no seguimento de um desequilíbrio iónico provocado pelos poros formados pela toxina. Um reequilíbrio da pressão osmótica por uma molécula incapaz de atravessar os poros impede o movimento de entrada de água e portanto, a lise celular. Em nenhum caso a molécula de protecção impede a formação dos poros pela toxina.

4.6. Apoptose e Necrose

Várias citotoxinas bacterianas, conhecidas por provocar a necrose das suas células alvo, podem igualmente induzir a apoptose nessas mesmas células (Menestrina *et al.*, 1994). Numa última série de experiências pesquisou-se se o efeito de fracas doses de α -Xlis poderiam induzir a apoptose dos hemócitos de *S. littoralis*. Para tanto foram preparadas monocamadas de hemócitos, a partir da hemolinfa de larvas de *S. littoralis* do último estado, os quais foram incubados em presença de α -Xlis com diluições 500x et 1000x em meio de cultura (ou seja, títulos de hemólise calculados a 0,002 e 0,001 UAH). O tempo de incubação foi de 16h a 28°C e na obscuridade.

No final desta incubação as monocamadas são tratadas com um marcador por intermédio do método TUNEL (Material e Métodos, 2.3.1.). Nas condições do ensaio observou-se uma percentagem de células que apresentam os núcleos fluorescentes muito mais elevada quando comparada com as monocamadas testemunha, tratadas do mesmo modo mas incubadas em meio de cultura isento de α -Xlis. A morfologia dos núcleos fluorescentes, na observação em microscopia confocal, com o ADN repartido em várias massas densas no interior de uma mesma célula (Fig. 37) é bastante característica de células em apoptose.

No entanto, a coloração pelo método não é, por si só, um teste suficiente para afirmar em definitivo que as células estão de facto em apoptose. Conhecem-se casos de necrose nos quais a reacção TUNEL foi positiva. Esta é a principal razão pela qual nenhuma conclusão definitiva pode ser tirada destes resultados. Apesar de tudo, com grande probabilidade eles mostram que a α -Xlis, em doses fracas, pode ser responsável pela indução da apoptose dos hemócitos, a acrescentar à sua conhecida actividade necrótica, como é testemunha o resultado do padrão de fragmentação do ADN pertencente aos hemócitos submetidos a doses mais fortes de α -Xlis, (Fig. 38).

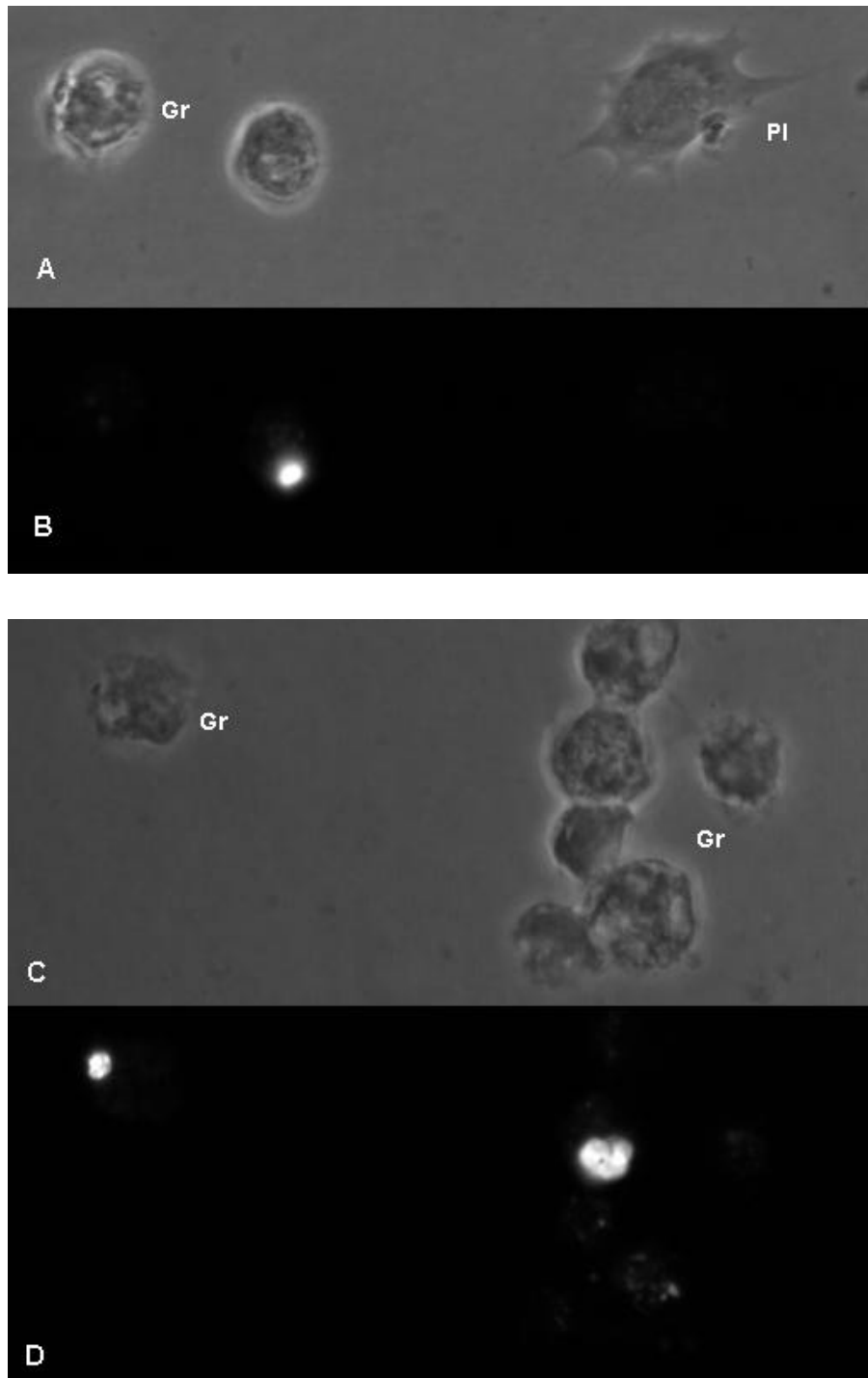


Fig. 37 - Observação em microscopia confocal da marcação TUNEL de hemócitos *S. littoralis*, incubados em presença de α -Xlis com diluições 500x et 1000x em meio de cultura (ou seja, títulos de hemólise calculados a 0,002 e 0,001 UAH). O tempo de incubação foi de 16h a 28°C. De notar que as células que aparecem com as massas nucleares fluorescentes são os Granulócitos. Esta marcação pode ser tomada como reveladora de células em apoptose. x400.

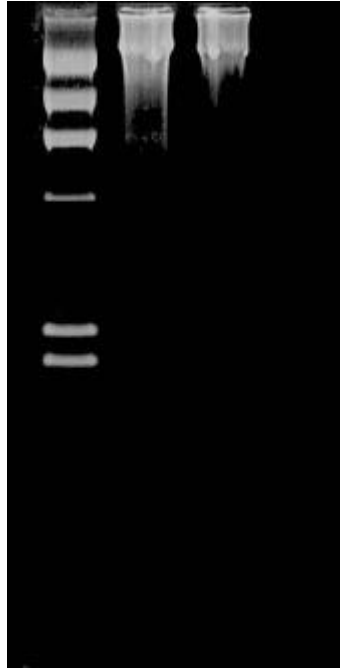


Fig. 38 – Electroforese em gel de agarose mostrando o padrão de fragmentação do ADN hemocitário submetido a fortes doses de α -Xlis. Na pista da esquerda encontram-se os padrões de ADN e nas pistas seguintes dois extractos de ADN hemocitário de células submetidas a doses 1/16 e 1/32 de uma fracção indutora de 95% de mortalidade. O ADN não se apresenta fragmentado como é característico da apoptose o que indicia que as doses utilizadas são suficientemente fortes para provocarem a necrose celular com a consequente não fragmentação e precipitação do ADN.

4.7. Outros tecidos alvo

Os fragmentos do intestino médio de *G. mellonella*, *M. unipuncta* e *S. littoralis* testados *in vitro* em presença da α -Xlis apresentaram-se profusamente necrosados no final de uma hora de incubação, avaliado pelo azul Trypan. Com efeito, notou-se uma forte mortalidade celular das células intestinais e ao fim de duas horas de incubação o tecido apresentava-se já bastante desagregado, assistindo-se a um fenómeno que se pode descrever como histólise. As secções dos mesmos tecidos incubados, nas mesmas condições de tempo e temperatura, em presença de tampão PBS ou em tampão das fracções da α -Xlis, não apresentavam o grau de mortalidade celular que foi observado nos tratamentos e a histólise não ocorreu.

4.8. Estudo da cinética de produção de α -Xlis *in vivo*

A injeção das suspensões de bactérias com as diluições [-3] e [-4] provocou, respectivamente, a morte de 95% (=TL95) e a 50% (=TL50) das lagartas em cerca de 20-22 e 26-28 horas e de 10-12 e 14-16 horas. Por seu lado, a sementeira em NBTA da hemolinfa revelou a presença de colónias azuis de bactérias na Fase I. Os insectos dos lotes das testemunhas, lagartas não-injectadas e lagartas injectadas com tampão estéril, não apresentaram mortalidade larvar e a sementeira em NBTA da sua hemolinfa não revelou a presença de bactérias. Por conseguinte, estes resultados indicam uma forte patogenicidade de *X. nematophila*.

Finalmente, não foi possível evidenciar a presença de actividade hemolítica ou citolítica/citotóxica na hemolinfa dos insectos injectados com as duas suspensões bacterianas. Com efeito, todos os ensaios foram negativos não tendo sido possível efectuar a cinética de produção *in vivo* da α -Xlis.

Os resultados obtidos estão de acordo com o que se sabe sobre o modo de acção da molécula citotóxica. Com efeito, quando a bactéria está presente na hemolinfa do insecto, não é possível efectuar a detecção da α -Xlis porque imediatamente à sua produção extracelular ocorre a interacção com as membranas celulares, em particular, com as dos hemócitos: Assim sendo, à medida que é lançada na hemolinfa ocorre a sua interacção com as membranas celulares sendo impossível detectar a actividade citotóxica/hemolítica porque uma vez fixada às membranas biológicas a toxina não é reciclada.

4.9. Estudo das alterações do hemograma de *S. littoralis* após injeção de *X. nematophila*

As Figs. 39 e 40 e representam, respectivamente, a evolução do hemograma diferencial (CDH) e total (CTH) das lagartas do sexto estado (segundo dia) de *S. littoralis* injectadas com uma suspensão de *X. nematophila*.

Da análise da CDH parece ser evidente que as células mais atingidas com a proliferação bacteriana são os plasmatócitos. Note-se, contudo, que o exame em microscopia óptica revelou que os granulócitos, às 27 h pós-incubação, eram maioritariamente células mortas. Com efeito, a coloração pelo azul Trypan revelou que a quase totalidade dos granulócitos estavam corados de azul, logo eram células mortas, atingidas por necrose celular. Não deve ser destituído de sentido o facto de se assistir a uma hematopoése dos granulócitos, dado que o seu número aumenta nos insectos injectados com bactérias, porque são as células responsáveis pela fagocitose. De facto, a resposta fisiológica do insecto à invasão bacteriana deverá ser a síntese de novas células imunocompetentes cuja função é a de efectuar a limpeza dos vasos microbianos. Apesar de tudo, o sistema de defesa celular mostrou-se incapaz de combater com êxito a infecção porque às 27 h pós-injeção os granulócitos apresentavam-se maioritariamente mortos e ao longo do tempo não foi possível observar a fagocitose de bactérias. De resto, entre as 25-30 h pós-injeção as lagartas atingiam o TL de 95-100%.

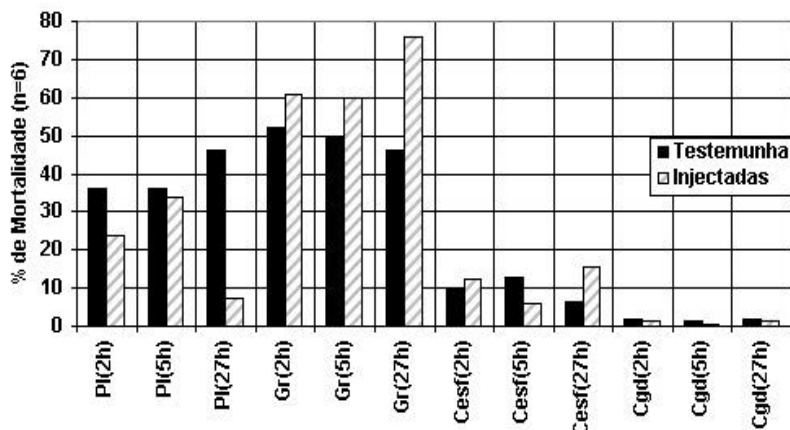


Fig. 39 – Variação do hemograma diferencial das lagartas do sexto estado de *S. littoralis* injectadas com *X. nematophila*. De notar que enquanto o número de plasmatócitos diminui o dos granulócitos aumenta nos insecto injectados, no entanto, as lagartas atingem 100% mortalidade pelas 30 h.

A variação do hemograma total, por seu turno, permitiu constatar que após um período de diminuição do número dos hemócitos, entre a 1 e as 5 h pós-injecção, se assiste a uma tímida recuperação mas que não é consequente exactamente porque os efeitos deletérios da bactéria se fazem sentir com o gradual abaixamento do número de hemócitos ao longo do tempo. Pelas 30 h todas as lagartas estavam mortas e as bactérias proliferavam na cavidade geral dos insectos. De notar que a recolha da hemolinfa, para o exame microscópico, revelou a não melanização deste fluido vital nas lagartas infectadas.



Fig. 40 - Variação do hemograma total das lagartas do sexto estado de *S. littoralis* injectadas com *X. nematophila*. Entre a 1 e as 5 h pós-injecção o número de hemócitos diminui ao que se segue um ligeiro aumento. No entanto, a população hemocitária total, a partir das 6 h sofre uma diminuição gradual e sustentada até à morte das lagartas.