

2ª Parte

Material e Métodos

1. Material Biológico

1.1. Insectos

As três diferentes espécies de insectos utilizadas foram produzidas e mantidas em cultura nos insectários existentes no Departamento de Biologia da Universidade dos Açores, São Miguel, Portugal e na Station de Pathologie Comparée de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), St. Christol-les-Alés, França.

1.1.1. *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae)

Os estados larvares deste insecto são produzidos sobre meio alimentar constituído por pólen e cera de abelha. As posturas de *G. mellonella* são recolhidas nas caixas arejadas onde se desenvolveu uma determinada geração de insectos e colocadas sobre meio alimentar fresco em novos recipientes com uma densidade populacional de 50-70 indivíduos caixa. O conjunto é mantido em câmara climatizada sob condições controladas com a temperatura a 27° C, a humidade relativa a 65%±5% e na obscuridade.

Nas condições em que se produziram as lagartas de *G. mellonella* os ovos eclodiram entre uma a duas semanas após a postura e os novos indivíduos desenvolveram-se durante cerca de 5 semanas até ao último estado larvar (pré-ninfore). Nos ensaios utilizaram-se lagartas deste estado de desenvolvimento depois de terem sido libertadas das primeiras sedas do casulo com que começavam a envolver-se.

1.1.2. *Mythimna unipuncta* e *Spodoptera littoralis* (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)

As crisálidas e os adultos de *M. unipuncta* e *S. littoralis* são colocadas em armazões metálicas envolvidas por rede fina. A alimentação dos adultos consiste numa solução aquosa de mel de abelha a 10% embebido em algodão hidrófilo. As posturas são recolhidas e colocadas sobre o meio alimentar artificial simplificado, Poitout e Bues, (1970; 1974), modificado por Vieira e Pintureau (1993). Estes recipientes, com uma densidade populacional de 25 indivíduos/caixa, são mantidos em câmara climatizada sob condições controladas à temperatura de 23° C, humidade relativa a 65%±5% e fotoperíodo (L:E) de 12:12 h.

Os ovos de *M. unipuncta* eclodiram 5 a 6 dias após a postura e o desenvolvimento das lagartas durou, em média, 4 semanas até atingirem o último estado larvar (L6) onde permaneceram 7 dias. Por seu turno, para *S. littoralis* a eclosão dos ovos ocorreu 4 a 5 dias após a postura e o desenvolvimento das lagartas durou, em média, 3 semanas até atingirem o último estado larvar (L6) onde permaneceram 6 dias. O último estado larvar destes insectos foi o único considerado no presente trabalho.

1.2. Complexo simbiote nematobacteriano

O complexo simbiote nemátodo-bactéria, *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditida: Steinernematidae) e *Xenorhabdus nematophila* (*Enterobacteriaceae*) corresponde à estirpe isolada de amostras provenientes de Plougastel na Bretanha, França, que é mantido nas colecções de nemátodos entomopatogénicos (NEP) existentes tanto no Departamento de Biologia da Universidade dos Açores, São Miguel, Portugal como no Centre INRA de Antibes, Laboratoire de Nématodes Entomophages, França. O complexo simbiote é, também, designado por *S. carpocapsae* ou simplesmente por nemátodos (N).

1.2.1. Multiplicação de *S. carpocapsae*

Os nemátodos foram produzidos sobre *G. mellonella* segundo o método de exposição controlada descrito por Dutky e Hough (1955) e Dutky *et al.*, (1964) e a incubação do sistema de parasitismo decorreu à temperatura de 28° C na obscuridade durante 48 h. Em resumo: colocaram-se 50 lagartas em pré-ninfore numa caixa de Petri com o fundo forrado com papel de filtro Whatman N° 3-4. Sobre os insectos depositou-se 1-mL de uma suspensão aquosa de juvenis infectantes na concentração de $3-4 \times 10^3$ -nemátodos/mL.

Utilizaram-se as armadilhas de White (White, 1927) para a recolha das larvas dos nemátodos no estado infectante. As armadilhas são compostas por uma caixa de Petri de vidro com Ø=20 cm dentro da qual se inverte uma metade inferior de uma outra caixa com Ø=9 cm. Sobre esta última coloca-se um círculo de papel de filtro ou de pano cru branco cortado com Ø=14 cm. No interior da caixa maior vertem-se 25 mL de água bidestilada com a qual os bordos do papel, (ou do pano), devem entrar em contacto.

No final, as lagartas mortas foram retiradas e lavadas em água bidestilada, imersão e ligeira agitação, e, seguidamente, colocadas em alinhamentos concêntricos sobre o papel (ou pano) das armadilhas. Ao fim de 8 a 12 dias, recolheram-se os nemátodos em recipientes cónicos de decantação e lavaram-se três vezes em água bidestilada. No final, foram mantidos em suspensão aquosa à temperatura de 10° C, no interior de caixas de plástico ou em frascos de 250 mL com cápsula de 0,22 µm para arejamento, à razão de $3-4 \times 10^3$ nemátodos/mL.

1.2.2. Desinfecção em superfície da cutícula de *S. carpocapsae*

Os nemátodos foram incubados numa solução de cloreto de metilbenzotónio a 1% durante 15 minutos e, depois, abundantemente lavados

com água bidestilada estéril. A suspensão aquosa estéril dos nemátodos foi armazenada à temperatura de 10° C em frascos de 250 mL com cápsula de 0,22 µm para arejamento à razão de 3-4x10³ nemátodos/mL.

1.2.3. Isolamento e caracterização de *X. nematophila*

As bactérias foram isoladas a partir dos nemátodos desinfetados em superfície e colocadas em incubação numa cultura no meio Tyrode-Hemolinfa (MTH), a 80 rpm, 23° C durante 48 h. As bactérias libertadas pelo nemátodo foram inoculadas em gelose de gelose nutritiva segundo Boemare e Akhurst (1988) ou um meio electivo constituído pelo ágar nutritivo suplementado com azul de bromotimol (NBTA) e cloreto de trifenil tetrazólio (TTC) segundo a formulação originalmente descrita por Akhurst, (1980). A incubação durou 48 h a 28° C e a caracterização das colónias fez-se pela absorção específica do corante, (Boemare e Akhurst, 1988; Boemare *et al.*, 1997a).

1.2.4. Multiplicação e armazenamento de *X. nematophila*

Após isolamento, as colónias de *X. nematophila*, foram mantidas a 15° C em NBTA, a multiplicação em pré-culturas fez-se por inoculação nos meios líquidos LB (Luria-Bertani) ou TSB (digerido tripsínico de soja) e a incubação durou 12 h a 28° C e 160 rpm de agitação.

Observou-se, contudo, independentemente da origem das bactérias, que as colónias de *X. nematophila* vão perdendo a viabilidade em função do tempo de armazenamento em NBTA. Quando repicadas de colónias com mais de um mês verificou-se que a sua viabilidade era muito baixa ou nula. Com efeito, as colónias bacterianas nestas condições revelaram-se sistematicamente não viáveis. No entanto, essa viabilidade não era posta em causa se as bactérias fossem repicadas para meio NBTA fresco em intervalos de tempo mais curtos, nomeadamente, duas a três semanas.

Por forma a aumentar e garantir a confiança no material biológico procedeu-se ao encurtamento para duas semanas do intervalo de tempo entre as repicagens. Concomitantemente, diminuiu-se para três o número máximo permitido de repicagens consecutivas das colónias para meio NBTA fresco e, em consequência, o tempo total do armazenamento bacteriano nunca excedeu seis semanas.

O armazenamento, por longos períodos, foi feito com a suspensão de bactérias de uma pré-cultura em LB ou TSB e glicerol bidestilado estéril (1:5 v/v). Após homogeneização as amostras guardaram-se em azoto líquido. Dado que as bactérias foram sistemática e metodologicamente descartadas, no final da terceira repicagem consecutiva em NBTA, a reposição do material biológico fez-se a partir das bactérias armazenadas em azoto líquido, por períodos não superiores a 6 meses. As bactérias que se destinaram aos diferentes bioensaios tiveram sempre a sua origem nos tubos crioconservados em azoto líquido.

1.3. *S. carpocapsae* axénico

Os nemátodos axénicos foram preparados a partir de ovos, segundo o protocolo descrito por Boemare *et al.*, (1982), produzidos pelo Laboratoire INRA de Pathologie Comparée em St. Christol-les-Alés, França, tendo sido fornecidos em caixas de Petri com meio de fígado gelosado.

Em resumo, o protocolo é o seguinte: Procedeu-se como em 1.2.1. para obter o parasitismo por exposição controlada. Ao fim de quatro dias efectuou-se a dissecação das lagartas e recuperaram-se as fêmeas adultas gigantes grávidas da primeira geração de *S. carpocapsae*. Estas fêmeas foram lavadas duas vezes e guardadas até à ovoposição, em solução de Ringer ou em solução de Tyrode, Após a ovoposição, recuperaram-se os ovos e procedeu-se à sua desinfecção superficial nas soluções aquosas de hipoclorito de sódio 10% durante 10 min ou em cloreto de metilbenzotónio a 1% durante 15 min. De seguida, efectuaram-se três lavagens, em solução de Ringer ou Tyrode estéreis, e os ovos foram depositados em caixas de Petri contendo gelose de fígado.

Cerca de um mês depois, os nemátodos axénicos foram recolhidos por sucessivas lavagens da superfície da gelose de fígado com 10 mL de água bidestilada estéril. Nestas condições estavam presentes todos os estados larvares dos nemátodos. Em alternativa, para o isolamento dos juvenis infectantes das larvas dos restantes estados, recorreu-se às armadilhas de White (1927) estéreis. Nestas depositaram-se pedaços da gelose de fígado sobre o papel de filtro ou o pano. Após a recolha, os nemátodos axénicos foram, na maioria dos casos, imediatamente utilizados. O armazenamento da suspensão aquosa estéril dos nemátodos só, raramente, se efectuou por curtos períodos de tempo, (1-3 dias), à temperatura de 10° C em frascos de cultura de 250 mL com cápsula de 0,22 µm para arejamento.

1.4. Complexo simbiote monoxénico

O procedimento para a obtenção controlada de nemátodos monoxénicos é semelhante ao enunciado para o número anterior com uma única variante: os ovos dos nemátodos foram colocados em meio de fígado gelado em presença das bactérias simbiotes isoladas pelo método acima descrito (1.2.3.). Recolheram-se os nemátodos com armadilhas de White (White, 1927) e o armazenamento em esterilidade decorreu à temperatura de 10° C em frascos de 250 mL com cápsula de 0,22 µm para arejamento.

1.5. *X. nematophila* - estirpe F1/1

A estirpe F1/1 de *X. nematophila* pertence à colecção de bactérias entomopatogénicas existente no Laboratoire de Pathologie Comparée da Université de Montpellier II em Montpellier. Esta estirpe está caracterizada (Boemare e Akhurst, 1988) e foi obtida a partir de nemátodos da espécie *S. carpocapsae* isolados de amostras de solo provenientes de Plougastel na Bretanha, França.

1.5.1. Extracção e doseamento de LPS de *X. nematophila*

Os lipopolissacáridos (LPS) de *X. nematophila* foram extraídos e preparados segundo a metodologia descrita por Ní -Eidhin e Mouton, (1993) que, em resumo, é a seguinte: A biomassa bacteriana, proveniente da incubação em TSB, (48h a 23° C), foi obtida por centrifugação do meio de cultura a 30000xg, 30 min a 4° C. As bactérias foram ressuspensas e lavadas em tampão (Yoshimura, *et al.*, 1984), para remoção das fí mbrias e de vestí gios do meio de cultura e centrifugadas nas mesmas condições. O segundo precipitado bacteriano foi liofilizado e reduzido a pó fino. Deste, 25 mg foram homogeneizados com 1 mL de água Milli Q, incubado 15 min a 100° C e depois uma nova centrifugação, o sobrenadante foi incubado, 1h a 60° C, com uma solução de proteinase K (0,05%). A proteinase foi inactivada por incubação a 100° C durante 5 min seguida de uma nova centrifugação (5 min-19000xg) e o sobrenadante dialisado contra água ultrapura. Este operação foi repetida e o dialisado liofilizado, o qual passou a representar o extracto bruto de LPS.

O doseamento dos LPS foi feito de acordo com o Boletim Técnico N° 210 da Sigma, que acompanha o Lisado de Amebócitos de *Limulus polyphemus*, E-Toxate® (Sigma 210-B1), utilizando o protocolo aconselhado pelo fabricante o qual permite a detecção e semi-quantificação de LPS (endotoxinas).

1.5.2. Determinação da curva de crescimento populacional de *X. nematophila*

Prepararam-se cinco pré-culturas bacterianas em meio LB líquido e a incubação durou 12-14 h a 23° C e 160 rpm. De seguida, prepararam-se cinco culturas frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio LB líquido aos quais se adicionou 500 µL da pré-cultura anterior. Estes frascos incubaram à temperatura de 23° C e agitação a 160 rpm durante 48 h.

Em intervalos de 3 h retiraram-se alíquotas de 100 µL, adicionadas a 900 µL de tampão fosfato salino (PBS: 62 mM NaCl, 2 mM KCl, 0,9 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 8 mM NaH₂PO₄, 8 mM KH₂PO₄) efectuando-se a leitura da Densidade Óptica (DO) num espectrofotómetro (540 nm). Como testemunha usou-se o meio de cultura onde não cresceram bactérias. Os valores da densidade óptica obtidos permitiram traçar um gráfico representando a curva aleatória de multiplicação populacional bacteriana em função do tempo.

1.6. Bioensaios

1.6.1. Injecção de *X. nematophila*. Estudo da cinética de produção de factores citotóxicos *in vivo*

Nestes ensaios foram usadas bactérias que apresentavam um crescimento populacional, em meio LB líquido, cuja DO estava compreendida entre os valores de 1,5-2,0 Abs.

Assim que o crescimento atingiu a DO do intervalo requerido, estabeleceram-se várias diluições, compreendidas entre 10⁻¹ até 10⁻⁶, em tampão MgSO₄. Um volume de 100 µL de cada uma das diluições 10⁻⁵ e 10⁻⁶ foram inoculadas em LB-ágar ou gelose nutritiva (NA) e NBTA para, respectivamente, se efectuar contagem das Unidades Formadoras de Colónias (UFC), de modo a permitir o conhecimento do título da suspensão, a sua viabilidade e controlar a fase bacteriana efectivamente injectada. Por seu lado, as diluições 10⁻³ e 10⁻⁴ destinaram-se a serem injectadas nos insectos após o título da suspensão ter sido corrigido e ajustado para, respectivamente, ±100 e ±1000 bactérias: O objectivo é o de injectar bactérias da Fase I com um número situado dentro daquele intervalo, porque estas doses, relativamente pouco elevadas, não deverão conduzir, por si mesmas, à morte das lagartas.

Utilizaram-se lagartas de *S. littoralis* pertencentes aos segundo e/ou terceiro dia do sexto estado larvar, em bom estado sanitário, de dimensão semelhante e peso uniforme para todos os bioensaios. Nas injecções utilizou-se

um suporte microinjector de metal para seringas do tipo insulina de 1 mL munidas de agulha hipodérmica (tipo Ø25Gx5/8-0,5x16 mm ou Ø30Gx1/2-0,3x13 mm). O êmbolo do microinjector foi calibrado de modo a permitir injeções controladas de pequenos volumes situados entre 5-30 µL.

As lagartas foram colocadas a 4° C durante 15 min e, imediatamente antes de serem injectadas, a superfície cuticular foi desinfetada com uma mistura de etanol/clorofórmio (1:1). Por cada insecto injectaram-se 20 µL das diluições das suspensões bacterianas consideradas até perfazer, no final, tantos lotes quantos os necessários. Para cada um destes lotes de ensaios acrescentaram os das testemunhas que compreenderam insectos injectados com tampão MgSO₄ e insectos não-injectados. Após a injeção as lagartas foram colocadas isoladamente em caixas de incubação com compartimentos individuais (4x4x3 cm) à temperatura de 23° C, humidade relativa a 65%±5%, fotoperíodo (L:E) de 12:12 h e tempo de incubação até às 48 h.

1.6.2. Avaliação e quantificação da mortalidade larvar

Após a injeção das suspensões bacterianas as lagartas foram inspeccionadas, em intervalos de tempo regulares, para avaliar o tempo de sobrevivência e a percentagem de mortalidade. A morte foi diagnosticada pela ausência de resposta a estímulos de contacto exteriores. A mortalidade foi expressa em percentagem cumulativa diária e os ensaios terminaram com a morte do último insecto.

Determinou-se o tempo letal 50 (TL50) e o tempo letal 95 (TL95) que correspondem, respectivamente, ao tempo médio em que ocorre a morte de 50% e 95% insectos em função da dose de bactérias injectadas. Durante o período de observação foram, periodicamente, sendo efectuadas recolhas de hemolinfa e de hemócitos.

1.6.3. Manipulação das lagartas e recolha da hemolinfa

As lagartas foram sempre colocadas a 4° C durante 15 min ao que se seguiu

a desinfeção da superfície cuticular com uma solução de etanol-clorofórmio (1:1). A obtenção da hemolinfa foi feita ao nível de uma das falsas patas i) por excisão, com a ajuda de uma tesoura de microdissecção ou ii) por punctura, com a ajuda de um alfinete entomológico estéril.

Nestes bioensaios, em intervalos de tempo de 5 h, a hemolinfa de cinco insectos foi recolhida para o interior tubos contendo alguns cristais de feniltioureia (PTU). No final de cada recolha, obtiveram-se quatro tubos contendo um volume de hemolinfa correspondente a: 1) cinco insectos do lote dos injectados com a suspensão bacteriana correspondente à diluição 10^{-3} ; 2) cinco insectos do lote dos injectados com a suspensão bacteriana correspondente à diluição 10^{-4} ; 3) cinco insectos injectados com tampão $MgSO_4$ e 4) cinco insectos não-injectados. De cada um destes tubos retiraram-se duas alíquotas de 100 μ L de hemolinfa sendo a primeira para análise e observação das células em microscopia óptica e a segunda para espalhamento e cultura de bactérias em meio NBTA. Os hemócitos foram observados em microscopia segundo os métodos citológicos de caracterização e contagem total e diferencial abaixo descritos (2.1.1. e 2.1.2.).

No final, os tubos foram centrifugados a 19000xg durante 10 min para precipitação das células e bactérias, permitindo a recuperação do plasma sobrenadante que foi imediatamente guardado em azoto líquido. Este plasma serviu, ulteriormente, como solução onde se pesquisaram as actividades citolíticas/citotóxicas (5.2.1) e hemolíticas (5.3.1.).

2. Técnicas de Citologia

2.1. Microscopia Óptica

Os resultados foram obtidos com aparelhos equipados com microscopia confocal, contraste de fase e epifluorescência de UV e, os de microscopia óptica invertida, equipado com contraste de fase e dispositivo sobreplatina para manipulação electrofisiológica das células.

2.1.1. Caracterização das populações hemocitárias em microscopia óptica. Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH)

Para este ensaio recolheu-se uma gota de hemolinfa ($\pm 100 \mu\text{L}$) directamente sobre uma lâmina de vidro que foi, de imediato, recoberta com uma lamela (24x50 mm). A observação fez-se em contraste de fase com as objectivas de 40x e de imersão. O material biológico foi observado pela inspecção metódica e exaustiva, de toda a superfície útil do conjunto lâmina-lamela, com a ajuda dos movimentos de varrimento longitudinais e transversais da sobreplatina. No caso particular da contagem diferencial de hemócitos, o número mínimo de hemócitos observados por lagarta foi de mil e os resultados foram expressos em média da percentagem diferencial de hemócitos.

2.1.2. Contagem Total de Hemócitos (CTH)

As lagartas são previamente pesadas e a hemolinfa foi directamente depositada nas câmaras de contagem de um hemacitómetro. Numa primeira

apresentação os resultados foram expressos em média do número total de hemócitos/volume (CTH/mm³) ao que se seguiu a sua correção baseada no peso dos insectos.

2.1.3. Variação do volume de hemolinfa

A determinação do volume de hemolinfa (VH) e da sua variação diária, em *M. unipuncta* e *S. littoralis*, fez-se baseado no método descrito por Yeager e Munson (1950). Em resumo: injectaram-se as lagartas com 5 µL de uma solução a 1% de vermelho de amarante (p/v) em PBS. Passados 5 min, recolheu-se a hemolinfa em microtubos onde foram previamente colocados alguns cristais de feniltiourea (PTU), centrifugando-se a 19000xg durante 5 min. Da hemolinfa sobrenadante retiram-se 50 µL que se colocam num dos compartimentos das microplacas de 96 poços medindo-se a DO com o espectrofotómetro leitor de microplacas a operar a 490 nm. As densidades ópticas assim obtidas foram comparadas com uma curva de referência calculada a partir da diluição do vermelho de amarante em diferentes volumes de hemolinfa conhecidos, (50 µL-750 µL, intervalo de 50 µL). A equação da recta, da curva de calibração dos coeficientes de diluição do corante, permitiu o cálculo do volume de hemolinfa das amostras em análise.

2.1.4. Variação da imagem sanguínea

O conjunto populacional dos insectos foi diariamente vigiado e as lagartas do quinto estado foram isoladas e colocadas em recipientes individuais cilíndricos de polistireno com cerca de 50 cm³ de volume, com grelha na tampa para arejamento, à temperatura de 23° C, humidade relativa de 65%±5% e fotoperíodo de 12:12 h (L:E). A inspecção matinal dos recipientes, para limpeza e renovação do alimento, permitiu determinar o momento da passagem do quinto para o sexto estado larvar. Deste modo, foi possível estabelecer, manter e seguir uma cultura de insectos dos quais se conheciam as idades com base no dia de

desenvolvimento do sexto ou último estado larvar. A variação da imagem sanguínea total e diferencial, ao longo do tempo de duração deste estado larvar de *M. unipuncta* e *S. littoralis*, foi efectuada por intermédio do cálculo diário da CTH e da CDH num universo de dez lagartas/dia. No caso da CDH, foi de mil o número mínimo de células observadas por insecto. O VH foi, por sua vez, calculado com base na hemolinfa de 30 insectos/dia.

2.1.5. Obtenção de hemócitos em monocamadas

Para os ensaios com células *in vitro*, a obtenção extemporânea dos hemócitos, fez-se a partir da hemolinfa recolhida em tubos com tampão anticoagulante (62 mM NaCl, 10 mM EDTA, 30 mM citrato tripotássico, 26 mM ácido cítrico) mantido a 4° C, na proporção de 1:3 (v/v) respectivamente. O número total de células em suspensão foi calculado por contagem ao hemacitómetro. De seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 800xg durante 15 s a 4° C, o sobrenadante descartado e o precipitado hemocitário ressuspensão, por pipetagens suaves e repetidas, em PBS completo contendo Ca²⁺ e Mg²⁺ a 290-320 mOsmol*Kg¹ H₂O e pH 7,2. O volume do tampão foi calculado para que a suspensão de hemócitos apresentasse um título médio ajustado na ordem de 1,5±0,1x10⁶ células/mL.

As monocamadas fizeram-se com a deposição de 20 µL da suspensão hemocitária sobre lamelas de vidro esterilizadas. O conjunto, formado pelas lamelas e as células, repousa durante 5 min numa câmara húmida à temperatura de 23° C, para total aderência celular. Passado este tempo retira-se o excesso de tampão, sobrenadante às células, substituindo-se por igual volume de tampão fresco.

Seguidamente, para se poderem efectuar as observações, as lamelas foram invertidas sobre lâminas de vidro porta-objectos normais ou lâminas de vidro especiais com uma pequena concavidade ou depressão central, (Ø cm e 1-2 mm de profundidade) repleta de tampão PBS (±100 µL).

As monocamadas de hemócitos também foram feitas sobre lâminas porta objectos, tendo sido o vidro esterilizado pelo calor à temperatura de 200-220° C durante 60 min. Neste caso, existiu uma particularidade que constou na

delimitação, à superfície da lâmina, de um círculo hidrófobo ($\pm 1-1,5$ cm) com DakoPen™ ou PapPen (Sigma Z37,782-1) na zona destinada à deposição dos hemócitos. Esta alteração permitiu a execução de ensaios onde se operou a manipulação de maiores volumes da suspensão hemocitária.

2.1.6. Preparação de culturas primárias de hemócitos

Em alternativa, ao método anterior, após a centrifugação dos hemócitos recolhidos no tampão anticoagulante, o precipitado hemocitário foi ressuspenso em meio G3. O número de células em suspensão foi calculado do mesmo modo e ajustado na mesma ordem de grandeza.

As placas de cultura de células de 24 poços foram preparadas com a deposição de lamelas de vidro de Ø12 mm esterilizadas no fundo de cada poço. Em cada um dos poços colocaram-se 200 μ L da suspensão de hemócitos que repousou 10 min para total aderência das células. De seguida, as células foram lavadas duas vezes com 500 μ L do meio de cultura o que permitiu retirar o excesso da solução tampão e de efectuar o equilíbrio dos hemócitos no novo meio. Estas lavagens descartaram a maior parte das células não aderentes à superfície das lamelas. As culturas primárias de hemócitos foram mantidas em 500 μ L de meio G3 a 23° C.

2.1.7. Linhagem celular *S/2b*

A linhagem celular denominada *S/2b*, proveniente de hemócitos de *S. littoralis*, foi obtida na Station INRA de Pathologie Comparée de St. Christol-les-Alés, França. As culturas desta linhagem celular foram mantidas a 24° C em volumes de 4 mL de meio G3 colocados em frascos de cultura celular em polistireno com 50 mL de capacidade e com uma superfície de 25 mm³ para aderência celular. A cultura foi repicada semanalmente para meio G3 fresco e o procedimento constou do seguinte: as células aderentes foram suavemente descoladas com um raspador e repostas em suspensão. Esta suspensão celular foi

transferida para novo meio à razão de 1 mL para 3 mL de meio fresco. Nestas condições, a cultura celular estará confluenta após uma semana de incubação.

2.1.8. Detecção da necrose celular. Avaliação da viabilidade e/ou mortalidade celular

A avaliação da viabilidade/mortalidade celular fez-se por intermédio do ensaio de exclusão do azul Trypan. As células vivas são capazes de selectivamente regular a permeabilidade membranar do plasmalema e, devido a este facto, apresentam a capacidade de excluir o azul Trypan dos seus domínios citoplasmáticos. Inversamente, as células necróticas, perderam a faculdade de regular a selectividade transmembranar e o azul Trypan atravessa livremente a membrana celular, invadindo o citoplasma e o compartimento nuclear, corando de azul o DNA genómico.

O ensaio que permitiu quantificar a percentagem de viabilidade e/ou mortalidade das células fez-se com uma solução de azul Trypan a 0,4% em tampão PBS directamente diluído no meio ou nas soluções tampão sobrenadantes às células (no final 0,04%). Depois da homogeneização efectuaram-se as observações ao microscópio óptico sendo a mortalidade celular calculada e expressa em percentagem de mortalidade total com base na razão entre o número total de células coradas de azul (não viáveis) e o número total de células observadas.

Em alguns casos efectuou-se, também, o cálculo da percentagem diferencial de mortalidade celular com base na razão entre o número de um certo tipo de hemócitos coradas de azul (não viáveis) e o número total de hemócitos desse tipo observadas.

2.1.9. Avaliação da aderência e/ou desaderência celular

As monocamadas de hemócitos (2.1.5.), obrigatoriamente efectuadas em lamelas de vidro flamejadas (25x25 mm), sobre as quais foram depositados 20 µL

da suspensão celular, foram observadas ao microscópio óptico após inversão das mesmas sobre lâminas de vidro especiais. Estas lâminas de vidro possuem uma depressão ou concavidade central com Ø2 cm e 1-2 mm de profundidade onde tinham sido previamente colocados 100 µL de PBS. As células que se mantiveram aderentes estavam acessíveis à observação no plano da superfície de vidro da lamela. As células descoladas ou que, simplesmente, não possuem aderência, foram observadas depositadas no fundo da depressão. Os movimentos verticais da sobreplatina, comandados pelo o parafuso micrométrico, permitiram a observação das células aderentes e não-aderentes. A desaderência ou descolamento celular foi expressa em percentagem e o seu cálculo efectuado com base no número de células encontradas no fundo da concavidade e o número total de células observadas.

2.1.10. Detecção de receptores membranares Lectina ou LPS sobre hemócitos *in vitro* e *in vivo*

Prepararam-se duas soluções padrão à concentração de 200 µg/mL em PBS e tampão anticoagulante (TAcg) de lectinas-FITC (=lectinas conjugadas com isotiocianato de fluoresceína) de *Triticum vulgare*, *Lens culinaris*, *Bandeiraea simplicifolia II*, *Arachis hypogea*, *Helix aspersa* e *Canavalia ensiformis*.

De igual modo, prepararam-se duas soluções padrão à concentração de 500 µg/mL (50 000 unidades de endotoxina) em PBS e TAcg de LPS-FITC (=Lipopolissacáridos conjugados com isotiocianato de fluoresceína) de *Serratia marcescens* e *Escherichia coli*. Segundo o Boletim Técnico N° 210 da Sigma cada uma das soluções, com concentração de 1mg/mL de LPS-FITC, possui 100 000 unidades de endotoxina.

A recolha da hemolinfa fez-se directamente para dentro um tubo contendo tampão anticoagulante. Após centrifugação a 800xg durante 15 s a 4°C o sobrenadante foi descartado e o precipitado hemocitário ressuspenso nas diferentes soluções de Lectina-FITC (200 µg/mL, 100 µg/mL e 20 µg/mL) ou LPS-FITC (500 µg/mL e 300 µg/mL) e a incubação durou 15 min à temperatura ambiente e na obscuridade. As células foram de novo centrifugadas a 800xg

durante 15 s a 4° C, o sobrenadante descartado e o precipitado hemocitário lavado e ressuspenso em PBS. De seguida, 20 µL das diferentes suspensões de hemócitos foram colocados sobre lâminas de vidro e, ao fim de 5 min, recobertas com uma lamela.

Os ensaios *in vivo* executaram-se por injeção de 20 µL das soluções de Lectina-FITC (200 µg/mL) e de LPS-FITC (500 µg/mL) em larvas do sexto estado de *S. littoralis* e *M. unipuncta*. A recolha da hemolinfa fez-se directamente para dentro um tubo contendo tampão anticoagulante. Após centrifugação a 800xg durante 15 s a 4° C o sobrenadante foi descartado e o precipitado hemocitário lavado e ressuspenso em PBS. De seguida, depositaram-se 20 µL da suspensão celular sobre uma lâmina de vidro e o conjunto incubou 5 min em câmara húmida para aderência dos hemócitos. Recobriu-se com lamela e observou-se num microscópio óptico equipado com epifluorescência a operar no comprimento de onda de excitação ultravioleta compreendido entre 450-490 nm e filtro de emissão a 530 nm.

2.1.11. Observação de vacúolos celulares e quantificação do grau de vacuolização

Nestes ensaios usaram-se culturas primárias de hemócitos obtidas pelo protocolo acima descrito (2.1.5.) e estabelecidas em poços com e sem lamela de vidro. Após retirada do meio G3 sobrenadante inicial, as células foram colocadas em presença de 300 µL de uma solução 8,0 mM de vermelho neutro em meio G3 durante 8 min. De seguida, as células foram lavadas três vezes, 3 min por lavagem, com o mesmo meio com volumes de 300 µL, 600 µL e 900 µL respectivamente. Após ter sido descartado o excesso de meio da última lavagem as células, dos poços onde não foram depositadas lamelas, são expostas a 800 µL durante 5 min a uma solução alcoólica ácida composta por etanol a 70% e HCl a 37% (v/v). Esta solução foi completamente retirada dos poços e colocada em cuvetes de espectrofotómetro e a leitura foi feita com o aparelho a operar a 405 nm.

Retiraram-se as lamelas dos restantes poços, montaram-se entre lâmina e lamela com a face celular virada para a lâmina de vidro, observaram-se ao microscópio óptico com e sem contraste de fase.

2.1.12. Análise Estatística

Procedeu-se ao tratamento estatístico dos resultados e, após transformação em arcsin, os dados foram estudados por análise de variância e as médias foram comparadas com recurso ao método Duncan de Análise Multicomparada. O grau de confiança utilizado em todas as análises foi de $\alpha=0.05$. Nos casos mais simples efectuou-se uma análise com o teste t de student.

2.2. Microscopia Electrónica

2.2.1. Caracterização ultraestrutural de hemócitos em microscopia electrónica de transmissão

Para a observação e caracterização estrutural de hemócitos em microscopia electrónica de transmissão (MET) os hemócitos, recolhidos em tampão anticoagulante e centrifugados, foram fixados numa mistura 1:1 de solução fixadora de glutaraldeído 1% e formaldeído 1%, (v/v), em tampão cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,2, (ou tampão fosfato 100 mM, pH 7,2), Karnovsky (1965). Após meia hora, à temperatura ambiente, a mistura fixadora foi substituída por glutaraldeído a 5%, em tampão cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,2, (ou tampão fosfato 100 mM, pH 7,2), e a fixação decorreu durante 3 h à temperatura ambiente.

Os hemócitos foram, então, centrifugados a 700xg, durante 2 min, e a solução pré-fixadora foi removida por intermédio de três lavagens, de 10 min cada, no tampão da fixação. A pós-fixação decorreu com tetróxido de ósmio a 1%

em tampão cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,2 durante 2 h, à temperatura ambiente.

A desidratação foi feita pela série ascendente da acetona ou etanol, depois de se terem efectuado 3 lavagens de 15 min cada no tampão da pós-fixação para a total remoção do fixador.

O material foi infiltrado e impregnado pelo uso da mistura ascendente óxido propileno/Epon 812 ou etanol/Epon 812 e, finalmente, incluído na resina Epon 812 pura em moldes de polipropileno. A polimerização decorreu numa estufa a 60° C durante 72 h.

Os cortes semifinos e ultrafinos foram executados, com faca de diamante, num ultramicrotomo LKB de avanço térmico. As secções semifinas foram colocadas e coladas em lâminas de vidro, coradas com azul de tolúidina boratada a pH 9,0 e montadas com lamela para observação em microscopia óptica. As secções ultrafinas foram recolhidas em grelhas de cobre, com malha de 200 mesh, e contrastadas pelo acetato de uranilo/citrato de chumbo, Reynolds (1963).

A observação e a obtenção das fotomicrografia foram feitas em MET ambos a operar a 80 kV.

2.2.2. Preparação do material biológico para observação em microscopia electrónica de varrimento (MEV)

Os hemócitos em monocamadas aderentes a lamelas de vidro, foram fixados com uma solução de glutaraldeído a 5% em tampão cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,2, (ou tampão fosfato 100 mM, pH 7,2). A fixação decorreu à temperatura ambiente durante 1 h e a solução pré-fixadora foi removida por intermédio de três lavagens, de 10 min cada, com o mesmo tampão.

A pós-fixação durou 1 h, à temperatura ambiente, em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,2. A desidratação foi feita pela série ascendente de etanol, depois de se terem efectuado 3 lavagens de 15 min

cada no tampão da pós-fixação para a total remoção do fixador. Os hemócitos, em banho de etanol a 100%, foram submetidos à secagem pelo ponto crítico e metalizados. As observações foram feitas num MEV a operar a 15 kV.

2.3. Detecção da Apoptose Celular

2.3.1. Apoptose em culturas primárias de hemócitos

A apoptose celular foi avaliada pelo método TUNEL ou método para a detecção da morte celular *in situ*, (Boehringer Mannheim Cat. Nº 1 684 795) que permite detectar e quantificar, a nível unicelular, a morte celular programada, baseado na marcação fluorescente dos fragmentos de DNA especificamente obtidos pela acção das endonucleases activadas durante o processo de apoptose.

Nos ensaios de apoptose celular sobre hemócitos *in vitro* usaram-se culturas primárias de hemócitos estabelecidas sobre lamelas de vidro inseridas nos poços de microplacas de cultura de células.

As células foram fixadas em paraformaldeído a 4%, extemporaneamente preparado em tampão Tris-salino (TBS: 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl e ajustar o pH 7,5 com HCl), durante 10 min à temperatura ambiente. Terminada a fixação as células foram lavadas duas vezes em TBS e incubadas, durante 4 min a 4° C, com a solução de permeabilização composta por 0,1% de Triton X-100 e 0,1% de citrato de sódio. Após a permeabilização as células foram lavadas duas vezes em TBS e as lamelas colocadas em novas caixas de cultura com os poços secos sobre as quais se depositou a mistura reaccional.

A preparação da mistura do ensaio TUNEL fez-se mediante as instruções que acompanham o conjunto. Em resumo: juntam-se 50 µL da solução da enzima transferase desoxinucleotidil terminal ao tubo contendo a solução dos nucleótidos-FITC. Sobre as células foram depositados 50 µL da mistura de reacção e as lamelas imediatamente colocadas numa câmara húmida a 37° C

durante 60 min na obscuridade. Terminada a incubação reaccional as lamelas foram lavadas três vezes em TBS, por imersão rápida no tampão. Sobre uma lâmina de vidro colocaram-se 20 µL de Mowiol e as lamelas foram invertidas sobre este líquido de montagem.

A observação fez-se em microscopia óptica de epifluorescência ou em microscopia confocal e as lâminas podem ser guardadas no frio, em câmara húmida e na obscuridade.

2.3.2. Padrão de fragmentação do DNA genómico

2.3.2.1. Extracção do DNA genómico dos hemócitos

A suspensão de hemócitos de *S. littoralis* ($\pm 5 \times 10^7$ células/mL) foi obtida segundo o método acima descrito (2.1.4.). Os tubos foram centrifugados a 1000xg durante 5 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas e lavadas em tampão PBS a 4°C. Repetiu-se a lavagem e centrifugação das células. No final, ressuspenderam-se os hemócitos em tampão de digestão e a incubação durou de 12-18 h à temperatura de 50°C num banho-maria com agitação em tubos bem fechados.

Para a extracção dos ácidos nucleicos juntou-se, ao tampão da digestão, igual volume da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (1:1:1) e o conjunto foi submetido a forte agitação durante 5-10 min findos os quais se centrifugaram os tubos durante 10 min a 1700xg.

Para a purificação do DNA transferiu-se o sobrenadante aquoso da camada superior, para um novo tubo. Calculou-se o volume deste sobrenadante ao qual se adicionou metade do seu volume de 7,5 M de acetato de amónio e o dobro do seu volume de etanol a 100%. Recuperou-se o DNA por centrifugação durante 2 min a 1700xg. O precipitado foi lavado com uma solução aquosa de etanol a 70%. Deixou-se decantar e secar o etanol.

2.3.2. 2. Electroforese em gel de agarose do DNA genómico

O ADN, obtido pela metodologia anterior, foi redissolvido em 20 μ L de água ultrapura. A esta solução juntou-se 20% do tampão de depósito e a amostra foi colocada num poço de um gel de agarose a 0,8% (p/v). A migração fez-se numa tina de electroforese horizontal a operar a 60 V (\pm 80 mA) durante 1 h e 30 min. No final da migração, o gel foi corado com uma solução aquosa de brometo de etí dio (2 mg/l) durante 10 min, lavado em água e a observação fez-se num transiluminador de UV a operar no comprimento de onda de 254 nm.

2.4. Caracterização electrofisiológica de hemócitos

Para os registos electrofisiológicos, as monocamadas de hemócitos de insectos foram preparadas em lamelas de vidro. Após ter-se verificado a adesão dos hemócitos, (\pm 5 min) as lamelas foram transferidas para a câmara de registo de um microscópio invertido (IMT2, Olympus), continuamente perfusionada à temperatura ambiente (fluxo de 5 mL/min) com a solução extracelular ou tampão Krebs 10 mM HEPES (pH = 7.4), contendo: 124 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 10 mM D-Glucose (com borbulhamento de O₂/CO₂ : 95/5). borbulha

As pipetas porta-eléctrodos de vidro borossilicato do tipo CG 120-10 com 75 mm de comprimento, 1,2 mm de \varnothing externo e 0,69 mm de \varnothing interno, (Clark®, GB) foram preparados com uma extensora térmica de vidro (Sutter Instruments, Modelo P-97, USA) a operar segundo as instruções do fabricante para a obtenção de pipetas com 4-10 M Ω de resistividade.

As correntes electrofisiológicas foram medidas por intermédio da técnica de contacto hermético (=patch-clamp) nas configurações células aderentes às pipetas porta-eléctrodo (=“cell-attached”) nos modos i) sobre a célula (=“on cell”) e ii) célula inteira (=“whole-cell”) e, finalmente, no modo iii) interior para fora (=“inside-out”). Em resumo: nas duas configurações de células aderentes à pipeta porta-eléctrodo, esta efectua o contacto hermético e fica em selagem permanente

com a membrana. No modo, i) sobre a célula a solução intraeléctrodo é uma solução extracelular que recria as condições do meio externo. Neste caso, o acesso ao registo electrofisiológico só respeita à porção da membrana que está confinada ao contacto com o diâmetro interno da pipeta porta-eléctrodo; ii) no modo célula inteira a membrana em contacto com o espaço do diâmetro interno da pipeta porta-eléctrodo sofre uma ruptura e a solução intraeléctrodo é uma solução do tipo intracelular. Neste caso, existe continuidade entre o interior do pipeta porta-eléctrodo e da célula e o acesso aos registos dizem respeito a toda a membrana celular; finalmente, no modo iii) interior para fora destaca-se uma porção da membrana cujo interior fica exposto ao meio exterior. Neste caso, a porção de membrana fica presa na ponta da pipeta porta-eléctrodo, tendo-se acesso aos registos do comportamento do hemifolheto interno da membrana em contacto com as diferentes soluções em estudo.

As correntes unitárias foram registadas e gravadas com um amplificador de “patch-clamp” (Axopatch 200 B, Axon Instruments, USA) e digitalizados (Digidata 1200 Interface, Axon Instruments, USA). Os sinais foram filtrados a 1kHz e as amostras obtidas a 10kHz. O registo e a análise contínua das correntes foram executadas com os programas John Dempster (“WinWCP”).

Após o estabelecimento do contacto hermético entre a membrana celular e a pipeta de registo que contém o eléctrodo (“gigaseal”) o potencial da corrente foi fixado a -60 mV. O sistema esteve mantido inalterável durante alguns momentos para verificação da estabilidade e, de seguida, efectuaram-se saltos de potencial sucessivos de 20 mV com a duração de 2-3 s. A amplitude extrema destes saltos varia entre -100 e +80 mV ou entre -80 e +40 mV. Esta metodologia permitiu observar as diferenças de conductância celular, de estabelecer rapidamente a sua dependência da voltagem e, conseqüentemente, de obter a respectiva curva I/V.

No meio interno da pipeta porta-eléctrodo foram colocadas várias soluções isosmóticas, (290-320 mOsmol*Kg⁻¹ H₂O e pH 7,2) com diferentes composições iónicas: a solução extracelular (descrita acima), soluções ricas em potássio compreendendo 150 mM de gluconato de potássio em 50 mM de tampão HEPES (pH=7.4) ou 150 mM de cloreto de potássio em 50 mM tampão HEPES (pH=7.4), solução de tetraetilamónio (TEA) (a solução base contém 150 mM de cloreto de TEA em 50 mM de tampão HEPES, pH=7.4) e a solução de tetrabutílamónio

(TBA) (a solução base contém 150 mM de cloreto de TBA em 50 mM de tampão HEPES, pH=7.4), que serviram para estabelecer o padrão normal da caracterização electrofisiológica dos hemócitos. Estas soluções serviram, também, para efectuar as diluições das amostras biologicamente activas provenientes dos processos de purificação cromatográfica abaixo descritos. Nos ensaios, tanto na configuração “cell-attached” como “inside out”, os factores citotóxicos (0.9 UAH ou 95% de mortalidade hemocitária) foram usados à concentração de 1/16 diluí dos na solução intraeléctrodo ou aplicados em banho exterior às células, respectivamente.

2.5. Medição da concentração do cálcio citossólico livre. Cálcio total na população de hemócitos e em células individuais

A concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) foi medida com o indicador fluorescente Fura-2 (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Para este propósito, a monocamada de hemócitos de insectos foi preparada tanto em lamelas de vidro rectangulares (20x7 mm) como quadradas (10x10 mm). Após a adesão, as células foram expostas ao Fura-2, durante 30 min à temperatura ambiente, para carregamento intracelular com este composto. A incubação decorreu em presença da solução extracelular, descrita acima, contendo 5 μ M de Fura-2AM e 0.02% de plurónico. Após lavagem, as lamelas rectangulares foram inseridas numa cuvete de quartzo de um espectrofluorímetro Aminco-Bowman 2 (SLM Instruments, USA) e posicionadas num ângulo de 45° em relação ao feixe de excitação. A cuvete de quartzo continha a citotoxina diluída (1/16 de uma solução com 0.9 UAH e \pm 95% de mortalidade hemocitária) na solução extracelular termostaticada a 25° C e agitada magneticamente. A fluorescência do Fura-2 foi obtida pela excitação da preparação com emissões alternadas a 340 e 380 nm e pela monitorização e registo das emissões (F340 e F380) a 510 nm. A razão das emissões a 510 nm (F340/F380) foi registada a cada 0.5 segundos. Alternativamente, as lamelas quadradas foram transferidas para a câmara de registo instalada num microscópio invertido (Leica, DMIRB). A emissão do Fura-2 foi obtida pela excitação alternada a 340 e 380 nm com um filtro circular

rotativo (Sutter Instruments). Os sinais fluorescentes foram recolhidos com uma câmara CCD (Hamamastu, Japan), digitalizados e analisados com os programas de análise de imagem da "Acquacosmos" (Hamamatsu, Japan).

2.6. Medição da concentração de potássio intracelular livre. Potássio total na população de hemócitos e em células individuais

De modo a registar o efluxo do potássio dos hemócitos de insectos, a concentração intracelular de potássio foi medida com um ligando do potássio fluorescente, benzofurano isoftalato (ou PBFI). Para este propósito, as monocamadas células foram elaboradas em lamelas de vidro quadradas (10x10 mm) e incubadas durante 30 min à temperatura ambiente com 5 μ M PBFI-AM e 0.02% de Plurónico diluí dos na solução extracelular. Após lavagem, as lamelas foram transferidas para a platina de um microscópio invertido (Leica DMLFS). A fluorescência do PBFI foi obtida pela excitação da preparação a 380 nm e a emissão recolhida a 510 nm. A análise e a digitalização foram feitas como descrito na secção anterior.

3. Técnicas de Purificação de Proteínas

3.1. Meios de cultura e condições de incubação

Procedimentos e condições genéricas

Previamente às incubações de i) *S. carpocapsae* axénico; ii) do complexo simbiote, ou iii) das bactérias, guardaram-se a -80°C ou em azoto líquido, várias

alíquotas estéreis de 1 mL dos diferentes meios de cultura para servirem ulteriormente de testemunhas em todos os ensaios biológicos. Por seu turno, ao longo do tempo de incubação, a intervalos considerados convenientes pela metodologia utilizada, foram retiradas alíquotas de 1 mL de todos os meios de cultura, as quais, após centrifugação e esterilização por filtração são, também, guardadas nas mesmas condições de temperatura.

3.1.1. Meios de cultura e condições de incubação do complexo simbiote, do nemátodo axénico e da bactéria

O complexo simbiote holoxénico, monoxénico ou o nemátodo axénico foram incubados em MTH ou TSB à temperatura de 23° C durante 48 h numa câmara com agitação orbital a 80 rpm. O inóculo fez-se à concentração de 3 nemátodos/ μ L em 10 mL de meio de cultura e colocado em recipientes do tipo Erlenmeyer de 100 mL. No início e no final do ensaio avaliou-se a monoxenia ou a axenia, por espalhamento em NBTA, ou gelose nutritiva/caldo nutritivo do meio de cultura dos nemátodos.

No caso da bactéria, o inóculo foi constituído por uma pré-cultura *X. nematophila* em meio LB com DO igual a 1,0 unidade de absorvância no comprimento de onda a 540 nm. A concentração de inóculo foi de 100 μ L por cada 10 mL de volume do meio MTH acondicionados em recipientes do tipo Erlenmeyer de 100 mL e a incubação durou 48 h em condições controladas de temperatura e agitação (23° C e 160 rpm). O procedimento foi igual quer se tratassem de bactérias isoladas a partir dos nemátodos monoxénicos ou das bactérias da estirpe F1/1.

Em alternativa, nos meios TSB ou LB, as condições de pré-cultura, concentração do inóculo e de incubação foram iguais variando o volume final do meio. Em consequência, o inóculo bacteriano foi de 3 mL e o volume dos meios de cultura foi de 300 mL contidos em recipientes de 3 L. Deste modo, todas as condições físicas se mantiveram inalteráveis assim como as biológicas nas devidas proporções. A determinados intervalos de tempo retiraram-se alíquotas

de 1 ml dos meios de incubação e efectuou-se a leitura da DO do crescimento populacional bacteriano.

3.2. Tratamento dos extractos brutos e obtenção dos sobrenadantes de cultura

Terminada a incubação nos diferentes meios cultura o procedimento geral foi o seguinte:

i) para remoção dos nemátodos os meios de cultura, do complexo simbiote (N) ou de *S. carpocapsae* axénico (Sc), foram previamente centrifugados a 1000xg durante 5 min, ao que se seguiu a recuperação do sobrenadante para uma nova centrifugação a 30000xg, durante 30 min a 4° C;

ii) por seu turno, as culturas bacterianas (Xn) foram imediatamente centrifugadas a 30000xg, durante 30 min a 4° C.

Terminadas as centrifugações, recuperaram-se os sobrenadantes para filtração com membranas de 0,22 µm e armazenamento em esterilidade. Os filtrados foram guardados a diferentes temperaturas: -20° C, -80° C ou em azoto líquido.

3.3. Preparação dos sobrenadantes dos meios de cultura para a cromatografia

3.3.1. Diafiltração

Os sobrenadantes de cultura NMTH, NTSB, ScMTH e XnMTH, foram diafiltrados em colunas PD10, Sephadex™ G-25M, (Pharmacia), segundo as instruções do fabricante. As colunas foram preparadas de modo a efectuar o equilíbrio das amostras nos tampões para as diferentes cromatografias. Após a

diafiltração as amostras foram centrifugadas a 10000xg durante 30 min, filtradas com membranas de acetato de celulose de 0,22 µm e guardadas a -20° C, -80° C ou em azoto líquido.

3.3.2. Precipitação com Sulfato de Amónio

Por seu turno, os sobrenadantes de cultura XnLB e XnTSB foram tratados com sulfato de amónio (AmoSO_4) para precipitação de proteínas. Em primeiro lugar, efectuou-se a precipitação a 50% durante 4-6 h a 4° C, em recipiente do tipo Erlenmeyer, com agitação de uma barra magnética. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 25000xg, durante 60 min a 4° C numa centrifuga preparativa. O precipitado foi descartado, recuperou-se o sobrenadante e efectuou-se a reprecipitação para 70% de AmoSO_4 nas mesmas condições das acima descritas.

De seguida, descartou-se o sobrenadante e recuperou-se o precipitado, com nova centrifugação a 25000xg, durante 60 min a 4° C, o qual foi redissolvido em tampão fosfato de sódio (TF: 10 mM, pH 8,0). Para completo equilíbrio e lavagem da eventual contaminação de AmoSO_4 presente no precipitado, as amostras foram dialisadas em membranas Visking, com 10 kDa de exclusão molecular, contra o mesmo tampão, na proporção de 1:50 (v/v), durante 24 h a 4° C em recipientes do tipo Erlenmeyer com agitação de uma barra magnética. Ao fim das primeiras 12 h de diálise o tampão foi mudado.

No final, o dialisado foi centrifugado a 10000xg durante 30 min, esterilizado por filtração, num sistema Nalgene® adaptável a frascos de vidro ISO, equipado com membranas de acetato de celulose de 0,22 µm e guardado no frio a -20° C, -80° C ou em azoto líquido.

3.4. Cromatografia líquida (FPLC e HPLC)

Os registos cromatográficos, que permitiram a análise bioquímica dos sobrenadantes, foram obtidos com dois tipos de equipamentos de cromatografia líquida de média e alta pressão, respectivamente, i) Sistema FPLC da Pharmacia, com os detectores UV operar a 214 ou 280 nm e ii) Sistema HPLC da Waters 990 equipado com um fotodíodo UV/V. Nas condições normais de trabalho foi possível efectuar um varrimento espectral que permitiu registar e gravar o evoluir do cromatograma em todos os comprimentos de onda no intervalo escolhido que, na máxima amplitude, se pode estender de 190 nm a 900 nm. Ulteriormente foi possível analisar a absorção das diferentes regiões/picos do cromatograma nos comprimentos de onda escolhidos.

As fases aquosas móveis das cromatografias foram feitas com água ultrapura (RO-Milli Q) e filtradas (0,22 µm) com membranas de acetato de celulose, para soluções aquosas, ou de Nylon, para soluções à base de solventes orgânicos e/ou ácidos. Todas as soluções foram extemporaneamente degaseificadas, por sonicação, num banho-maria com ultra-sons à temperatura de 27° C durante 45-60 min.

3.4.1. Cromatografias de troca aniónica em sistema FPLC Pharmacia

As cromatografias de troca aniónica foram feitas em colunas Mono Q 10/10 e Mono Q 5/5 da Pharmacia em equilíbrio no tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8,0 (=tampão A). As amostras, previamente à injeção, foram diafiltradas ou dialisadas nesta mesma solução. O tampão da eluição foi o do equilíbrio adicionado de 1 M de NaCl (=tampão B).

As proteínas fixadas à resina, da fase estacionária da coluna, foram eluídas com o tampão B, num gradiente de NaCl de 0-500 mM (ou 0-1 M) com

um fluxo de eluição de 20 mL/min, tendo sido variáveis tanto os débitos (1-3 mL/min) como os volumes das fracções (1, 3 ou 5 mL).

3.4.2. Cromatografia de filtração em gel no sistema FPLC Pharmacia

As colunas Superose 12 HR 10/30, (10x300 mm; Ø da partícula = 10 µm) e Superdex™75 HR 10/30 (10x300 mm; Ø da partícula = 13 µm) foram fornecidas pré-empacotadas e possuem, nas condições padronizadas pelo fabricante, uma amplitude de separação de proteínas globulares com pesos moleculares compreendidos, respectivamente, entre os patamares de 1-300x10³ Da e 3-70x10³ Da.

As amostras foram diafiltradas em colunas PD10, equilibradas em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8,0 com 150 mM de NaCl e injectadas nas colunas de filtração em gel, em equilíbrio no mesmo tampão.

O tampão da eluição/filtração foi o mesmo do equilíbrio. As condições para a filtração neste tipo de cromatografia foram, em geral, as seguintes: débito de 500 µL/min e fracções de 1 mL.

3.4.3. Cromatografia de filtração em gel no sistema HPLC Waters 990

Para as cromatografias em sistema HPLC a coluna de filtração em gel TosoHaas foi do tipo TSK G3000SW (600x7,5 mm; poro de 250 Å, Ø da partícula = 10 µm) e possui, nas condições padronizadas pelo fabricante, uma amplitude de separação de proteínas globulares com pesos moleculares compreendidos entre os patamares de 10-500x10³ Da.

As amostras foram diafiltradas em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 com 150 mM de NaCl e injectadas em colunas de filtração em gel, em equilíbrio no mesmo tampão.

O tampão da eluição/filtração foi o mesmo do equilíbrio. As condições para a filtração neste tipo de cromatografia foram, em geral, as seguintes: débito de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ e as frações têm um volume variável.

3.4.4. Cromatografia de fase reversa (C18) em sistema HPLC Waters 990

As amostras, acidificadas com uma solução aquosa (1:9; v/v) a 0,1% de ácido trifluoracético (TFA), foram injectadas em coluna de fase reversa NovaPak® C18 da Waters, (3,9x150 mm; poro de 60 Å, Ø da partícula 4 μm) em equilíbrio numa solução aquosa de TFA a 0,1%. As proteínas fixadas à resina, da fase estacionária da coluna, foram eluídas num gradiente de 0-100% de Acetonitrilo 100%/TFA 0.1%, (ACN/TFA) com um fluxo de 2%/min e débito de 1 mL/min. As frações, com volume variável, à medida que iam sendo recolhidas foram, de imediato, congeladas em azoto líquido e liofilizadas no final da cromatografia.

3.4.5. Análise em MALDI-TOF e Interrogação de Bancos Proteicos

A análise em MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight), para a qual se utilizou um aparelho da marca Perkin-Elmer, foi efectuada no Laboratoire des Mécanismes Moléculaires des Communications Cellulaires (UPR 9023, CNRS, Montpellier).

As amostras submetidas a esta análise foram as frações cromatográficas, biologicamente activas, provenientes da cromatografia de fase reversa C-18.

As amostras foram submetidas a análise com e sem digestão tripsínica. A tripsina utilizada na digestão serviu, também, para calibrar o aparelho. Esta técnica serve, resumidamente, para, numa primeira etapa, vaporizar e ionizar as moléculas de natureza peptídica/proteica, (MALDI). Seguidamente, as moléculas são submetidas a um campo eléctrico e o tempo que demoram a atingir o cátodo (TOF), faculto o cálculo da sua massa molecular. Esta técnica não é destrutiva

permitindo utilizar e analisar as moléculas não fragmentadas e obter a massa molecular total respectiva. Por outro lado, pode fragmentar-se a molécula, por digestão enzimática, e efectuar seguidamente a mesma análise. O resultado permitirá conhecer a quantidade e a massa molecular dos péptidos originados pela digestão tripsínica e, assim obter, uma “impressão digital proteica” ou o perfil peptídico da proteína em causa na análise. Os péptidos provenientes da autodigestão da tripsina são facilmente identificados no conjunto dos picos obtidos e, conseqüentemente, subtraídos ao perfil da proteína em análise. De notar, que a digestão tripsínica, fragmenta os péptidos/proteínas ao nível dos grupos carboxilo dos resíduos lisina e arginina. Deste modo, é possível obter com grande exactidão o perfil peptídico característico de cada proteína, ou seja, conhecer a quantidade de péptidos obtidos após digestão enzimática e as suas respectivas massas moleculares.

Estas informações podem ser utilizadas nas interrogações a bancos de dados proteicos para poder comparar o perfil obtido com os conhecidos e disponíveis. Em alguns casos, com base na massa molecular dos diferentes péptidos, os bancos de dados fornecem uma eventual proposta de sequência aminoácídica possível. Neste contexto, os bancos interrogados, na tentativa de identificação dos péptidos/proteína, foram os seguintes:

1 - Swiss-Prot

PeptIdent <http://tw.expasy.org/cgi-bin/peptident.pl>

Peptide Mass <http://tw.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>

NiceProt <http://tw.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl>

2 – ProFound <http://prow11.rockefeller.edu/profound/html>

4. Análise e quantificação de proteínas

4.1. Doseamento de proteínas

A detecção e quantificação de proteínas foi executado com o método colorimétrico BCA™ da Pierce. A metodologia seguida foi a descrita pelo fabricante e em resumo constou do seguinte: i) a solução de trabalho é composta por uma mistura de 50 partes do reagente A (BCA em tampão bicarbonato) com 1 parte do reagente B (solução aquosa de sulfato de cobre a 4%); ii) juntaram-se 2 mL desta solução a 100 µL de amostra, homogeneizou-se bem; iii) o conjunto incubou durante 30 min a 37° C, arrefecendo à temperatura ambiente e a leitura fez-se num espectrofotómetro a operar no comprimento de onda de 562 nm.

Este método combina a redução do Cu^{2+} a Cu^{1+} pelas proteínas em ambiente alcalino (reação do Biureto) com uma detecção sensível e selectiva do ião cuproso (Cu^{1+}) pela solução reagente que contém ácido bicinónico (BCA). A reação estiquiométrica combina duas moléculas de BCA por cada ião cuproso, formando um complexo molecular que exhibe uma forte absorvância a 562 nm e que é directamente proporcional ao aumento da concentração proteica.

4.2. Detecção e doseamento de actividades enzimáticas

4.2.1. Detecção da actividade proteásica

A detecção da actividade proteásica fez-se por incubação de 50 µL da solução a testar com 85 µL de uma solução de azoalbumina ou azocaseína a 2% em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,3 a 37° C durante 3 h.

Terminado o tempo desta incubação adicionaram-se 400 μ L de uma solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Repousou durante 10 min, à temperatura ambiente e centrifugou-se a 19000xg durante 5 min. O sobrenadante foi colocado numa cuvete de espectrofotómetro ao qual se adicionaram 700 μ L de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M. A leitura foi feita com o espectrofotómetro a operar no comprimento de onda de 440 nm.

As soluções de azoalbumina ou azocaseína servem de substratos cromogénicos solúveis para enzimas proteolíticas. O fundamento químico do ensaio baseia-se na digestão do substrato proteico (ácido sulfanílico-azoalbumina ou sulfanilamida-azocaseína) com libertação dos correspondentes péptidos cromogénicos. O TCA faz precipitar as proteínas remanescentes da digestão mas não os péptidos que continuam em solução. Após a centrifugação as proteínas não digeridas são precipitadas enquanto que na fracção solúvel se encontram os péptidos provenientes da digestão. Este sobrenadante cromogénico é colocado na cuvete do espectrofotómetro e a adição de hidróxido de sódio alcaliniza o pH para a zona onde o cromóforo indicador apresenta o seu pico de absorção no comprimento de onda a 440 nm.

Os valores de absorvância obtidos na leitura são referidos à curva de calibração e as unidades expressas em equivalentes de actividade proteásica da tripsina.

A curva de calibração da actividade proteásica da tripsina (Sigma T-8003) desenhou-se a partir de uma solução a 1 mg/mL (10000 U) em tampão fosfato de sódio 10 mM e pH 7,5. Com esta solução padrão efectuaram-se diluições seriadas (1/1 até 1/512) que serviram de amostras para cálculo da actividade proteásica. Os valores da variação absorvância em função da diluição obtiveram-se nas condições do ensaio acima descrito.

A unidade padrão de actividade da tripsina (U) ou unidade BAEE (benzoiil-arginina-etil-éster; Sigma B-4500) é definida do seguinte modo: Uma unidade BAEE da tripsina corresponde à variação da absorvância de 0,001/min no comprimento de onda de 253 nm, ($A_{253}=0,001\text{Abs/min}$), com BAEE como substrato a pH 7,6 a 25° C.

4.2.2. Detecção da actividade lipásica

A detecção da actividade lipásica fez-se por inoculação pontual de 20 µL da solução a testar sobre gelose nutritiva contendo 0,01% de cloreto de cálcio e 1% de Tween 20 ou 40 que servem de substrato enzimático (v/v) (Sierra, 1957). A incubação pode durar até 5 dias à temperatura de 28° C. As lipases hidrolisam os ésteres de glicerol das longas cadeias de ácidos gordos. O resultado desta hidrólise é o aparecimento de um precipitado à superfície da gelose devido à insolubilidade dos ácidos gordos que perderam o grupo glicerol.

4.2.3. Detecção da actividade lecitínica (fosfolipásica)

A detecção da actividade lipásica fez-se por inoculação pontual de 20 µL da solução a testar sobre gelose nutritiva contendo lecitina (fosfatidilcolina) de ovo que serve de substrato enzimático. O meio foi preparado segundo Boemare *et al.* (1997). As lecitinases A e B, correspondem, respectivamente, às fosfolipases A₂, B (A₁ e A₂). Estas enzimas possuem como substrato preferencial a fosfatidilcolina. A actividade enzimática caracteriza-se pela hidrólise dos ésteres de glicerol libertando os ácidos gordos nas posições C1 e C2 (fosfolipase A₂ e B). A actividade lecitínica é revelada pelo aparecimento de um halo opaco correspondente à precipitação dos ácidos gordos.

4.3. Electroforese em gel de sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A electroforese foi feita de acordo como protocolo de Laemmli (1970). As alíquotas foram dissolvidas em tampão SDS da amostra (2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0.002% azul de bromofenol, em tampão Tris-HCl, 125 mM, pH 6.8) e mantidas em ebulição durante 3 min. As amostras (50 µL) foram

aplicadas num gel de condensação a 5% e separação a 12% de acrilamida. A electroforese foi executada a 160 V durante três horas.

5. Bioensaios para a detecção e quantificação das actividades citotóxica e hemolítica

5.1. Ensaios de necrose celular sobre cultura de células da linhagem SI2b

Para os bioensaios de necrose celular usaram-se placas de cultura celular de 24 poços. No fundo de cada poço colocou-se uma lâmina redonda de vidro esterilizada pelo calor, (flamejada em etanol a 95%).

A partir de um frasco de cultura as células foram repostas em suspensão, recolheram-se 2 mL que foram diluídos em 22 mL de meio fresco e colocadas em novo recipiente. Esta suspensão celular, depois de bem homogeneizada, foi distribuída pelos 24 poços à razão de 1 mL por poço. A incubação fez-se a 23° C e as células estavam aptas a serem usadas ao fim de 3 dias.

Para se efectuarem os bioensaios de citotoxicidade, fizeram-se diluições da solução a testar com o meio de cultura celular fresco. Seguidamente, o meio em excesso foi retirado dos poços e substituído pelas diferentes diluições das amostras. O tempo de incubação durou de 1 até 24 h nas mesmas condições de temperatura. A avaliação da mortalidade celular fez-se com o ensaio de exclusão do azul Trypan diluído directamente no sobrenadante com a concentração de 0,04% no volume final. Após 5 min de incubação retiraram-se as lamelas com a ajuda de uma pinça de pontas finas. Estas lamelas foram colocadas sobre lâminas de vidro com a face celular virada para o exterior. Sobre as células depositaram-se 30 µL de meio de cultura e o conjunto foi recoberto com outra lamela de vidro (25x25 mm).

Observaram-se os resultados num microscópio óptico munido de contraste de fase. A citotoxicidade foi expressa em percentagem de mortalidade total de hemócitos calculada com base na razão entre o número total de células coradas de azul (não viáveis) e o número total de células observadas. Concomitantemente fez-se o cálculo da percentagem de mortalidade diferencial.

5.2. Ensaios sobre monocamadas de hemócitos

5.2.1. Necrose celular

Os ensaios foram elaborados de acordo com o estabelecido anteriormente (2.1.5.). Após 5 min, destinados a permitir a total aderência dos hemócitos às lamelas, o tampão sobrenadante às células foi substituído por 20 μ L das soluções a testar. Durante o período consagrado à incubação as células foram mantidas em câmara húmida à temperatura de 23° C. No final do tempo de incubação colocaram-se 2 μ L de azul Trypan a 0,4% (2.1.8). A percentagem de mortalidade de hemócitos foi determinada com base na razão entre o número total de células coradas de azul (não viáveis) e o número total de células observadas.

5.2.2. Vacuolização celular

A observação do eventual aumento do número de vacúolos celulares e quantificação do grau de vacuolização foi executada sobre culturas primárias de hemócitos (2.1.5.) mediante o protocolo acima descrito (2.1.11.). Após a retirada do meio G3 sobrenadante inicial, as células foram colocadas em contacto com diluições seriadas de amostras citotóxicas/hemolíticas no mesmo meio. Esta incubação decorreu a 23° C em intervalos de 15 min até 60 min. No final de cada intervalo de tempo, o sobrenadante foi retirado e as células foram colocadas em

presença de 300 µL de uma solução 8,0 mM de vermelho neutro em meio G3 durante 8 min. O ensaio continuou a decorrer nos moldes acima referidos (2.1.11.).

5.2.3. Descolamento celular

Os ensaios foram elaborados de acordo com o estabelecido em 2.1.9, no entanto, as monocamadas de hemócitos foram obrigatoriamente estabelecidas sobre lamelas de vidro (25x25 mm) sobre as quais foram depositados 20 µL da suspensão celular obtida em 2.1.5. Após 5 min o tampão sobrenadante às células foi substituído por 20 µL das soluções a testar. Durante o período consagrado à incubação as células foram mantidas em câmara húmida à temperatura de 23° C. No final do tempo de incubação colocaram-se 2 µL de azul Trypan a 0,4% (2.1.8) e, finalmente, as lamelas foram invertidas sobre lâminas de vidro escavadas, ou seja, com uma concavidade central com Ø2 cm e 1-2 mm de profundidade, onde tinham sido previamente colocados 100 µL de PBS. A percentagem de desaderência de hemócitos foi determinada com base na razão entre o número total de células descoladas da lamela, que se encontram depositadas no fundo da concavidade, e o número total de células observadas.

5.3. Ensaio sobre hemácias

5.3.1. Hemólise em meio líquido

Nos ensaios de hemólise em meio líquido o material biológico utilizado teve diferentes proveniências: i) hemácias de carneiro e coelho a 50% em suspensão tamponada fornecidas pela firma BioMérieux (França); ii) hemácias de carneiro, vaca, cabra, porco e coelho recolhidas em frascos heparinados no

Matadouro de Ponta Delgada; iii) hemácias humanas, de todos os grupos sanguíneos, recolhidas no Hospital de Ponta Delgada.

Nos bioensaios hemolíticos, o sangue humano foi manipulado no Laboratório do Serviço de Hematologia do Hospital de Ponta Delgada, onde existem condições para serem tomadas todas as precauções biológicas descritas nas normas em vigor.

Os ensaios hemolíticos fizeram-se com a preparação extemporânea de uma suspensão de hemácias a 5% em PBS. Para este efeito consideraram-se as hemácias a 100% nos casos ii) e iii). Após a correspondente diluição as hemácias foram lavadas uma vez no mesmo tampão. Entre as lavagens fez-se a centrifugação a 1000xg durante 2 min numa centrífuga de bancada. As células foram ressuspensas, por agitação suave, no tampão e guardadas a 4° C.

Para os ensaios hemolíticos a proporção de 2:1 (v/v) foi sempre mantida entre, respectivamente, o volume da solução a testar e o volume da suspensão de hemácias a 5%. Existiram sempre duas condições padrão consoante a quantidade disponível do material a testar: i) 200 µL de amostra e 100 µL da suspensão hemácias a 5% ou ii) 100 µL da amostra e 50 µL suspensão hemácias a 5%.

A incubação fez-se em tubos de microensaio de 1,5 mL à temperatura de 37° C durante 60 min. Terminada a incubação, centrifugaram-se os tubos a 19000xg durante 3 min. Do sobrenadante recuperaram-se 280 µL ou 130 µL, respectivamente, que são colocados em microcuvetes em polistireno cristal de espectrofotómetro e o volume final foi elevado a 900 µL com água ultrapura. A leitura das unidades de absorvância fez-se com o aparelho a operar no comprimento de onda de 540 nm.

A unidade de actividade hemolítica (UAH) foi definida pela DO medida após hemólise total de 50 µL de uma suspensão a 5% de hemácias de carneiro em 850 µL de água ultrapura. O título hemolítico de uma certa solução foi expresso em unidades de actividade hemolítica e calculou-se a partir da fórmula:

$$\text{UAH} = 2e(10*(D.O.-0,72))$$

deduzida de numerosas determinações da absorvância da actividade hemolítica, usando diluições em série de soluções activas. O mínimo de actividade hemolítica detectável por este método foi 0,005 UAH. DO é a densidade óptica da amostra a 540 nm (Abs_{540}).

Os resultados podem, ainda, ser expressos em percentagem de actividade hemolítica (Givaudan e Lanois, 2000; Brillard *et al.*, 2001) e o seu cálculo é determinado com base na razão entre a leitura da absorvância relativa ao bioensaio (A_{540} amostra com actividade - A_{540} testemunha sem actividade) e a absorvância correspondente a 100% de hemólise. Esta foi obtida após hemólise total de 50 μ L da suspensão de hemácias a 5% em 850 μ L água ultrapura.

5.3.2. Efeito do aumento da concentração das hemácias sobre a actividade hemolítica

O ensaio decorreu, em geral, nos moldes descritos no número anterior e foram somente usadas hemácias de carneiro em três suspensões com diferentes concentrações, 5, 10 e 20%. As amostras hemolíticas utilizadas apresentavam um título de actividade de 0,20 e 05 UAH e a incubação decorreu durante 3 h a 37° C. A testemunha foi elaborada com PBS a representar uma solução inactiva hemoliticamente.

5.3.3. Efeito do tempo de incubação sobre a actividade hemolítica

Numa segunda série de ensaios, para avaliar o efeito do tempo de incubação sobre a actividade hemolítica, fizeram-se várias diluições em PBS de uma amostra com actividade positiva e conhecida (=1 UAH). Os volumes utilizados foram de 100 μ L e as diluições seriadas corresponderam a valores de actividade bem definidos: 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125 UAH. Estas amostras incubam com 50 μ L de hemácias de carneiro a 5% a 37° C e a variação

da absorvância dos sobrenadantes é determinada em diferentes intervalos de tempo de incubação: 30 min até 24 h.

5.3.4. Protecção osmótica das hemácias contra a hemólise em meio líquido

Fizeram-se diferentes soluções a 30 mM em PBS de sacarose, rafinose, dextran 1000, 6000, 10000, 15000-20000 e polietilenoglicol (PEG) 3000, 4000, 6000, 8000, 10000 e 35000. Com cada uma destas soluções prepararam-se 3 mL de suspensões de eritrócitos de carneiro a 5%. Estas suspensões de hemácias serviram para realizar o ensaio hemolítico e, nas condições descritas para o ensaio de hemólise em meio líquido (5.3.1.) a 100 µL de cada uma das soluções com actividade hemolítica conhecida (diluições 1/2, 1/10 e 1/100 de uma solução com 1,0 UAH), juntaram-se 50 µL de cada uma das suspensões de hemácias e a incubação durou 60 min a 37° C. O ensaio foi controlado com testemunhas negativas e positivas, respectivamente, com PBS a substituir a solução com actividade hemolítica, enquanto que, a testemunha positiva se realizou com a amostra hemolítica e com a suspensão de hemácias em PBS.

Terminada a incubação fez-se uma centrifugação a 19000xg durante 5 min. O sobrenadante foi colocado numa cuvete de espectrofotómetro e o volume final elevado a 800 µL com H₂O bidestilada. A leitura das unidades de absorvância fez-se com o aparelho a operar no comprimento de onda de 540 nm.

Por seu lado, o precipitado eritrocitário foi ressuspenso e lavado durante 3 min com 1 mL das respectivas soluções glucídicas em PBS. Repetiu-se a centrifugação a 19000xg durante 5 min e o sobrenadante foi descartado. De seguida, ressuspenderam-se as hemácias em 800 µL de PBS e incubou-se por mais 60 min a 37° C.

Terminada esta segunda incubação, fez-se uma nova centrifugação, 19000xg durante 5 min, o sobrenadante recolocado numa cuvete de espectrofotómetro e a leitura da absorvância efectuou-se a 540 nm.

5.4. Efeito das membranas das hemácias sobre as actividades citotóxica e hemolítica

5.4.1. Obtenção da fracção membranar das hemácias de carneiro e coelho

Nestes ensaios utilizaram-se hemácias de carneiro e de coelho a 50% em suspensão tamponada fornecidas pela firma BioMérieux em recipientes de 5 mL de volume. Após uma boa homogeneização, por intermédio de agitação e rotação suave dos frascos, as hemácias foram distribuídas em alíquotas de 1 mL por diferentes tubos de centrifuga contendo de 50 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,0 estéril. Com este procedimento obteve-se a lise instantânea das hemácias. De seguida, centrifugaram-se os tubos durante 20 min a 10000xg, e, no final, o sobrenadante foi descartado e as membranas ressuspensas e lavadas no mesmo tampão por intermédio de quatro ciclos de centrifugação e ressuspensão. Terminadas as lavagens, as membranas foram ressuspensas em 5 mL PBS e guardadas no frio a 4° C em esterilidade. No final, a suspensão de membranas corresponde a 50%, ou seja, à concentração original das hemácias.

5.4.2. Efeito da fracção membranar das hemácias de carneiro e coelho sobre as actividades citotóxica e hemolítica

Cada uma das suspensões membranares anteriores a 5% com um volume de 100 µL são incubadas com 200 µL de uma fracção activa (0,9 UHA) durante 60 min a 37° C. Terminado o tempo de incubação os tubos são centrifugados a 19000xg durante 15 min e o sobrenadante é recuperado e dividido em duas alíquotas de 100 µL. De seguida, efectuam-se os bioensaios para avaliação *in vitro* da necrose celular/citotoxicidade sobre monocamada de hemócitos (5.2.1.) e de hemólise em meio líquido (5.3.1.).

5.5. Ensaios *in vivo* para produção, detecção e quantificação da actividade citotóxica e/ou hemolítica

O ensaio para a produção *in vivo* da actividade citotóxica e/ou hemolítica foi executado nos moldes do acima descrito (1.6.1. e 1.6.3.). Com este procedimento esperou-se poder produzir e detectar, na hemolinfa dos insectos injectados com as suspensões bacterianas, a actividade citotóxica/hemolítica, à semelhança do que se fez nas culturas *in vitro*.

Relembre-se que, os ensaios em 1.6.3., originaram quatro lotes distintos de hemolinfa, tendo sido, i) dois lotes de hemolinfa de lagartas injectadas com as suspensões de bactérias, diluições 10^{-3} e 10^{-4} , ii) dois lotes de hemolinfa de insectos testemunha que constaram de lagartas injectadas com tampão $MgSO_4$ e não-injectadas. O procedimento experimental foi realizado com cinco ensaios independentes e a hemolinfa obtida destinou-se a ser utilizada nos ensaios de detecção e quantificação das actividades: i) citotóxica sobre monocamadas de hemócitos (2.1.5.), culturas primárias de hemócitos (2.1.6) e a avaliação dos resultados foi elaborada com o teste de necrose celular ou da exclusão do azul Trypan (2.1.8.) e ii) hemolítica em meio líquido sobre hemácias de carneiro (5.3.1.).

5.6. Ensaios para detecção de LPS (endotoxinas)

A presença de LPS (endotoxinas) foi pesquisada em todas as amostras que apresentam as actividades citotóxica/hemolítica e desaderência de hemócitos, nos meios de cultura sem incubação que não manifestam tais actividades e nas diferentes soluções tampão. O teste utilizado foi o do Lisado Amebocitário de *L. polyphemus*, E-Toxate®, e a metodologia seguida foi a constante no Boletim Técnico N° 210 da Sigma.

5.7. Ensaios *in vitro* para detecção e quantificação da actividade citotóxica dos LPS sobre monocamada de hemócitos

Estes ensaios foram efectuados sobre culturas primárias de hemócitos (2.1.6) ou hemácias de carneiro e coelho em meio líquido (5.3.1.) de acordo com as metodologias descritas.

As concentrações de LPS em PBS foram calculadas para que os bioensaios tivessem sido executados em presença de $\pm 40\,000$ unidades de endotoxina. Os LPS utilizados foram os seguintes: i) LPS de *X. nematophila* obtidos pelo método descrito em 1.5.1; ii) LPS de *E. coli*, serotipos 026:B6, 055:B5, 0127:B8 e 0111:B4 (Sigma, respectivamente, L8274, L2880, L3129 e L2630); iii) LPS/Endotoxina padrão de *E. coli* 055:B5 (Sigma 210SE) e iv) LPS de *S. marcescens*, (Sigma L6136). Os resultados foram quantificados em percentagem de mortalidade hemocitária e em unidades de actividade hemolítica.

5.8. Intestino médio

As lagartas do sexto estado foram colocadas a 4° C durante 15 min ou a -20° C durante 3 min ao que se seguiu a excisão do intestino médio. Esta operação decorreu com a ajuda de uma mesa de dissecação preparado no interior de uma caixa rectangular de polistireno (15x10x3 cm) com o fundo revestido por cera ou parafina com a espessura de 1,5 cm.

O dispositivo foi repleto de PBS, no qual as lagartas foram mergulhadas, e a fixação pelas extremidades à cera ou parafina foi executada com a ajuda de alfinetes entomológicos. O seccionamento cuticular e a excisão do intestino operou-se com uma tesoura de microdissecção. A membrana peritrófica, e o seu conteúdo alimentar, foram imediatamente retirados e o intestino médio abundantemente lavado em PBS. Após as lavagens o tubo intestinal foi primeiro

seccionado longitudinalmente em todo o seu comprimento e, em segundo lugar, transversalmente em pequenas porções de 0,5 mm de comprimento e extemporaneamente conservadas em PBS a 4° C por 5-10 min.

Os pedaços de tecido assim obtidos foram utilizados em ensaios de citotoxicidade *in vitro* e as incubações duraram de 1 até 5 horas à temperatura de 28° C.

5.9. Protecção osmótica de hemócitos durante a incubação com amostras citotóxicas

As monocamadas de hemócitos foram primeiramente incubadas em presença de uma concentração constante, solução em PBS a 30 mM, de várias moléculas com eventual acção protectora (Sacarose, Rafinose, Dextran 1000, PEG 4000 e PEG 6000) e com a adição de várias doses de toxina (1UAH e suas diluições desde 1/2 até 1/16) para inferir qual a dose de toxina em que o diâmetro dos poros formados é menor do que a dimensão da molécula protectora (protecção efectiva da lise). A incubação decorreu durante 30 min a 23° C e a avaliação da mortalidade celular fez-se pelo ensaio da exclusão do azul Trypan.

5.10. Caracterização ultraestrutural de hemócitos após incubação com amostras citotóxicas

Para a caracterização estrutural de hemócitos em microscopia electrónica de transmissão os hemócitos foram recolhidos por intermédio da metodologia enunciada em 2.1.4.

Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado hemocitário ressuspenso em meio G3 por pipetagens suaves e repetidas. A suspensão de hemócitos assim obtida configura a preparação do primeiro lote de testemunhas para os bioensaios de citotoxicidade.

O segundo lote testemunha é realizado com a diluição 1:1 (v/v) de 100 µL da suspensão de hemócitos anterior com o tampão das cromatografias e/ou com uma fracção das mesmas que não apresentem a actividade pesquisada.

Para os bioensaios de citotoxicidade, propriamente ditos, a suspensão de hemócitos foi diluída com as fracções da cromatografia que apresentam o efeito citotóxico. Esta actividade é previamente avaliada em monocamada de hemócitos por intermédio da metodologia descrita em 2.3.2 ou 2.3.5.

Usaram-se duas metodologias de incubação:

1 - Fracções não diluídas, para incubação de hemócitos a diferentes tempos, (15'; 30'; 60'; 90'), à temperatura de 23° C. A fixação vai-se fazendo, de imediato, à medida que se esgota o tempo da incubação;

2 - Fracções diluídas na sua própria solução tampão, (1/2; 1/4; 1/8), para incubação de hemócitos durante uma hora à temperatura de 23° C. A fixação vai-se fazendo, de imediato, após ter sido esgotado o tempo de incubação.

A metodologia de fixação e seguintes é igual às descritas em 2.2.1 e 2.2.2.

5.11. Resistência dos factores citotóxicos e/ou hemolíticos e desaderência de hemócitos a factores físicos e químicos.

As amostras que apresentam as actividades citotóxica/hemolítica e de desaderência de hemócitos são testadas quanto à resistência a factores físicos (diálise e temperatura) e químicos (pH, acção da tripsina, EDTA e EGTA).

Nos ensaios conducentes à determinação da acção do pH, sobre a actividade citotóxica/hemolítica, as amostras activas são dialisados contra tampão fosfato de sódio 150 mM com valores distribuídos numa amplitude de 4-9 na escala de pH e com intervalos de 0,5 unidades. De seguida estas soluções são testados quanto às actividades pesquisadas e avaliadas a percentagem de mortalidade contra hemócitos de insectos e actividade hemolítica. Os ensaios para as testemunhas negativas são executados com as soluções tampão com

diferentes pH, enquanto que as testemunhas positivas são avaliadas com amostras biologicamente activas.

Nos ensaios de resistência à diálise o volume de 1 mL, de cada uma das amostras em análise, é colocado em tubos Visking com 10 kDa de exclusão molecular e dialisado durante 24 h contra 1 l de PBS.. Os ensaios para as testemunhas negativas são executados com a solução tampão das amostras enquanto que as testemunhas positivas são avaliadas com as soluções activas não dialisadas.

Para testar a resistência à temperatura colocam-se 100 µL de cada uma das amostras em análise em tubos de microcentrifuga. Estes tubos são incubados durante 30 e 60 min a um leque de diferentes temperaturas desde 4° C, 10° C até 100° C em intervalos de 10° C. O efeito das temperaturas negativas foi testado com a manutenção dos tubos a -170° C, -80° C e -20° C durante um e quinze dias. Os ensaios das testemunhas negativas foram executados com soluções que não apresentavam o efeito pesquisado. E os ensaios testemunhas positivas fizeram-se com as amostras activas que não foram sujeitas ao choque térmico.

A resistência à digestão pela acção de uma protease foi testada com uma solução de tripsina (Sigma T-8003; •10 000 U /m g) com a concentração final de 4×10^{-6} M directamente diluída nas amostras activas e a incubação durou 1 h à temperatura de 37° C. Terminado o tempo de incubação, os tubos foram colocados à temperatura ambiente até arrefecerem. Os ensaios testemunha foram executados com as soluções que não apresentavam o efeito pesquisado e que foram incubadas com tripsina nas condições descritas. Nas testemunhas positivas usaram-se as amostras activas isentas de incubação com a tripsina.

O estudo sobre a resistência aos agentes quelatantes fez-se pela diluição de 1 mM de EDTA ou EGTA nas soluções que apresentavam a actividade. Homogeneizou-se por agitação e deixou-se repousar durante 1 h à temperatura ambiente. Os ensaios testemunha foram executados com soluções que não apresentavam a actividade pesquisado, às quais se adicionaram os agentes quelatantes nas condições descritas. Nas testemunhas positivas usaram-se amostras activas às quais não foram adicionados os agentes quelatantes.

No final de cada uma das análises, recuperaram-se as amostras tratadas e efectuaram-se os ensaios de citotoxicidade (2.7.2.), hemólise (2.7.5.) e desaderência de hemócitos (2.7.3.).

5.12. Estudo da cinética da actividade hemolítica e/ou citotóxica mediante a temperatura de incubação

Para pesquisar o efeito da temperatura sobre a cinética da actividade hemolítica/citotóxica prepararam-se dois tipos de ensaios. No primeiro, vários conjuntos reaccionais contendo o número necessário de tubos com 100 µL de uma amostra activa com 0,9 UAH e 50 µL de hemácias de carneiro a 5% em PBS. Estes conjuntos incubam durante 2 h e 12 h no seguinte leque de temperaturas: 4° C, 10° C, 15° C, 23° C, 28° C e 37° C.

Decorridos os respectivos tempos de incubação, nas diferentes temperaturas, procedeu-se do seguinte modo:

i) os microtubos do primeiro conjunto foram todos colocados à temperatura de 4° C e, de imediato, se efectuou o ensaio de quantificação da hemólise em meio líquido;

ii) o segundo conjunto de microtubos foi retirado do primeiro leque de temperaturas e colocado a 37° C durante 1 h, ao fim da qual, se seguiu a quantificação da hemólise;

Numa segunda série de experiências os ensaios decorreram do seguinte modo:

iii) o conjunto reaccional foi colocado à temperatura de 4° C durante 1 h e, após a incubação os microtubos foram centrifugados a 19000xg durante 3 min. O sobrenadante foi colocado em novos tubos e incubados com 5% de hemácias de carneiro durante 1 h à temperatura de 37° C, ao que se seguiu a quantificação da hemólise;

iv) por seu turno, a fracção celular do precipitado em iii) foi ressuspensa em 150 μ L de PBS e reincubou durante 1 h à temperatura de 37° C, ao que se seguiu a quantificação da hemólise.

Procedeu-se, ainda, ao estudo da dependência da temperatura da actividade denominada C2 e o método foi idêntico ao constante em iii) e iv).