

## **4ª Parte**

### **Discussão**

O estudo fotónico dos hemócitos *G. mellonella* e *A. convolvuli*, e electrónico de *M. unipuncta* e *S. littoralis* revelou os mesmos tipos clássicos de células tal como têm sido descritas, em microscopia óptica e electrónica, por diversos autores para os insectos lepidópteros, (Harpaz *et al.*, 1969; Akai e Sato, 1973; Lai-Fook, 1973; Neuwirth, 1973; Raina e Bell, 1974; Beaulaton e Monpeysson, 1977; Arnold, 1979, 1982; Rowley e Ratcliffe, 1981; Essawy *et al.*, 1985; Ratcliffe *et al.*, 1985; Brehélin e Zachary, 1986; Ratcliffe *et al.*, 1986; Gupta, 1991; Ratcliffe, 1993; Drif e Brehélin, 1993). A única diferença que se encontra entre alguns dos artigos desta lista bibliográfica e o presente trabalho diz respeito à terminologia usada. Com efeito, ao longo do tempo tem-se assistido a uma tentativa de uniformização dos nomes pelos quais são designados os diferentes tipos de hemócitos. Contudo, esta tarefa não tem sido fácil principalmente porque as observações efectuadas revelam resultados que podem variar, consoante as espécies observadas, o estado de desenvolvimento larvar e/ou fisiológico dos insectos. Por exemplo, os estudos elaborados com base na microscopia óptica levaram Ashhurst e Richards (1964) e Jones (1967) a descrever um único tipo de células em *G. mellonella* que designaram por “adipohemócitos”, enquanto que Shapiro (1968) descreveu “adipohemócitos” e “hemócitos granulares”. Por seu lado os estudos em microscopia electrónica revelaram que, afinal, aqueles dois tipos de células apresentavam as mesmas características ultraestruturais e foram designadas por granulócitos, (Neuwirth, 1973), estas células são também designadas por “coagulócitos” devido à sua intervenção com os fenómenos de coagulação, (Gupta, 1991). Hoje em dia, de um modo consensual os quatro grandes tipos de hemócitos estão referidos como sendo os plasmatócitos, os granulócitos, os oenócitos e as células esféricas. Os dois primeiros tipos de células são consideradas as células imunocompetentes sobre as quais repousa o essencial das reacções de defesa celular e que mantêm sinergismos bidireccionais entre eles e com as reacções de defesa humoral, ou seja, o desencadear de certas reacções, tanto de natureza celular como humoral, são activadas por factores oriundos da outra componente do sistema de defesa.

No presente trabalho as características estruturais e funcionais dos diferentes tipos de células estão perfeitamente estabelecidas com base na classificação de Brehélin e Zachary (1986), retomadas por Drif e Brehélin (1993). De facto, nas diferentes espécies de insectos lepidópteros utilizados, os hemócitos são inequivocamente mencionados pela classificação que adoptámos e pela forma com que efectuámos o seu reconhecimento dando primazia às observações em microscopia electrónica sobre as de óptica. As classificações propostas para o reconhecimento dos diferentes tipos de hemócitos (Gupta, 1991) em microscopia óptica, são complicados e podem prestar-se a confusões, e não foram consideradas. Assim, os granulócitos possuem as características mencionadas para os hemócitos granulares do tipo I (GH1), (Brehélin e Zachary, 1986). Em *M. unipuncta* os GH1 exibem modificações morfológicas ao longo do desenvolvimento larvar e aquando em condições de incubação *in vitro*. De facto, os GH1, no final do sexto estado larvar, apresentam um comportamento reabsorptivo que fagocita os tecidos em curso de histólise e apresentam um citoplasma densamente povoado de grandes vesículas de endocitose. Estas mesmas observações e conclusões foram feitas por Essawy *et al.*, (1985) para uma outra espécie de lepidóptero noctuídeo, *Heliothis armigera*. No decurso das incubações *in vitro*, designadamente, em tampão PBS, alguns granulócitos apresentam desgranulação dos seus conteúdos vesiculares e este facto pode ser correlacionado com o comportamento destas células quando em contacto com corpos estranhos, tal qual foi descrito por Ratcliffe e Gagen (1977). Contudo, em tampão anticoagulante ou em meio G3, os granulócitos apresentam-se mais estáveis e o desgranulamento não ocorre ou é muito fraco. A perda do conteúdo vesicular dos granulócitos é considerada como uma reacção de reconhecimento e opsonização de corpos estranhos, (Drif e Brehélin, 1993; Pathak, 1993; Wiesner *et al.*, 1996).

Os estudos e observações sobre a evolução da imagem sanguínea permitiram constatar que em *M. unipuncta*, os granulócitos apresentam alterações do seu desenvolvimento morfológico com a idade da lagarta. De facto, observou-se que os granulócitos, no final do sexto estado larvar, se apresentam repletos de corpos de

reabsorção. Este fenómeno foi correlacionado com a crescente actividade fagocítica dos tecidos em curso de histólise. Nesta fase os granulócitos podem, facilmente, ser confundidos com células esféricas dado o seu aspecto de células contendo numerosas inclusões de dimensão apreciável. Este tipo de resultado foi também obtido por Essawy *et al.*, (1985) num outro insecto lepidóptero noctuídeo, *Heliothis armigera*. Nas outras três espécies de insectos não foi observável o comportamento reabsorptivo dos granulócitos, o que deverá estar correlacionado com um desenvolvimento fisiológico particular daquele insecto. Apesar disto, em *S. littoralis* o aparecimento das células de grânulos densos, no final do sexto estado larvar, poderia ter sido confundido com o mesmo fenómeno de células macrofágicas com características reabsorptivas, não tivessem sido as observações em microscopia electrónica que permitiu a caracterização ultrafina da estrutura celular.

Observou-se, frequentemente que as incubações em PBS provocaram o desgranulamento dos granulócitos aquando em contacto com o substrato, tal qual foi descrito por Ratcliffe e Gagen (1977). Este comportamento poderá estar correlacionado com o reconhecimento e/ou opsonização de corpos estranhos (Drif e Brehélin, 1993; Pathak, 1993; Wiesner *et al.*, 1996). como, por exemplo, a superfície de vidro das lâminas. Para muitos autores (Akai e Sato, 1973; Neuwirth, 1973; Raina e Bell, 1974; Wago, 1982; Essawy *et al.*, 1985; Brehélin e Zachary, 1986; Drif e Brehélin, 1993) os granulócitos dos lepidópteros são os hemócitos responsáveis pela fagocitose, enquanto que, para outros autores (Rowley e Ratcliffe, 1981; Ratcliffe, 1993), são os plasmatócitos as células fagocíticas. Existe um outro estudo (Tojo *et al.*, 2000) que concluiu que tanto os plasmatócitos como os granulócitos são capazes de efectuar a fagocitose em *G. mellonella*. Todos aqueles autores, em particular os dois penúltimos citados, são unânimes em considerar que os granulócitos desgranulam no momento da fagocitose. Assim, estas células podem ser, facilmente, identificadas como plasmatócitos. É um facto de que em microscopia óptica as células podem ser confundidas e que o único critério válido para distinguir os diferentes tipos morfológicos é a microscopia electrónica que permite observar a ultraestrutura

celular. Em todas as observações efectuadas ao longo do presente trabalho e nas espécies de insectos consideradas, o material injectado, (hemácias, esferas de látex e, até mesmo, bactérias), foi encontrado nos fagossomas das únicas células que apresentaram inequívocas capacidades fagocíticas, ou sejam, os granulócitos. É verdade que, algumas vezes, se não tivessem sido critérios de observação em microscopia electrónica, poder-se-ia ter concluído, erroneamente, que eram os plasmatócitos a desempenhar esta importante função de defesa celular. De facto, depois de terem desgranulado e fagocitado, os granulócitos, assemelham-se muito com plasmatócitos porque perdem mesmo algumas das características de células globulares envolvidas por numerosos filipodia. Acresce que, com o evoluir do tempo de incubação, entre lâmina e lamela, estas células tendem a adquirir uma forma achatada e, por vezes, fibroblástica como os plasmatócitos. Além disto, os granulócitos apresentam reactividade à enzima fosfatase ácida ao nível do lisossomas e complexo de Golgi e este facto permite-nos concluir que são as células macrofágicas por excelência existentes na hemolinfa de insectos lepidópteros.

Por seu turno, os plasmatócitos são considerados por todos como sendo as células responsáveis pelo encapsulamento. Na formação dos nódulos os hemócitos recrutados em primeiro lugar são os granulócitos seguidos pelos plasmatócitos aquando da continuação do fenómeno pela via da formação das cápsulas. Nos nossos estudos as observações que efectuámos permitiram concluir que as células envolvidas no encapsulamento eram os plasmatócitos.

Os oenócitos são considerados os únicos hemócitos que exibem actividade fenoxidásica e as nossas observações estão de acordo com a generalidade dos autores, designadamente, Drif (1983) em *Aedes aegypti*, Essawy *et al.* (1985) em *H. armigera* e Ashida *et al.* (1988) em *Bombyx mori*. Estas células, no entanto, ocorrem em quantidades diferentes e apresentam vários graus de estabilidade, segundo os insectos. Com efeito, em *S. littoralis* o seu número é diminuto e apresentam-se muito instáveis sendo difícil aceder à sua observação com regularidade. Nos outros insectos, porém, o seu número é ligeiramente mais elevado e a sua estabilidade mais duradoura. Em *M. unipuncta* e *G. mellonella*

são estáveis até, pelo menos, uma hora de incubação enquanto que em *A. convolvuli* é possível observarem-se após várias horas em PBS.

A função das células esféricas nunca foi definida inequivocamente. O comportamento destas células ao longo do tempo de duração do último estado larvar, indica que poderão ter importante papel no desenvolvimento dos insectos. De facto, no momento da passagem dos diferentes estados larvares o seu número varia, designadamente, aquando da passagem do último estado para pupa. Nitono (1960) correlacionou as células esféricas com a produção de seda em *B. mori*. Em *G. mellonella* é comum observarem-se células esféricas que perderam o seu conteúdo nos estados larvares correspondentes às pré-pupas durante a fase em que estes insectos tecem o seu casulo. Em *M. unipuncta*, além da mesma constatação, verifica-se que o seu número aumenta substancialmente nos últimos dois dias do sexto estado larvar, imediatamente antes da formação da crisálida. Em *S. littoralis* o seu número e transformações não são tão evidentes e importantes como nos outros insectos.

Quanto à variação da imagem sanguínea, no que concerne à contagem total de hemócitos, tanto de *M. unipuncta* como de *S. littoralis*, os resultados revelaram numa primeira análise (resultados não mencionados) que o número de hemócitos aumenta consistentemente entre o primeiro e o terceiro dia do sexto estado larvar. A partir deste dia, o seu número da contagem total de hemócitos mantém-se mais ou menos estável até ao penúltimo dia até que, na derradeira etapa do estado, o seu número sofre um decréscimo muito acentuado. No entanto, verificou-se que o volume de hemolinfa e o peso das lagartas apresentavam uma variação proporcional entre si e que era diferente da variação da CTH. De facto, tanto um parâmetro como o outro aumentam nos três primeiros dias do estado larvar até que diminuem sequencial e sustentadamente até ao último dia. Este comportamento pode correlacionar-se muito bem com o desenvolvimento do insecto e a contagem do número total de hemócitos pode ser influenciado pelo grau de diluição dos hemócitos no volume hemolinfático. Tendo em consideração esta premissa efectuou-se a correcção da CTH utilizando, não o volume da hemolinfa, mas o peso das lagartas dada a sua perfeita correlação e a menor

margem de erro obtida. De facto, a variação do volume e do peso é proporcional entre si e a que apresenta menores desvios padrões é o peso. Por conseguinte, a correcção da CTH foi feita com o peso das lagartas porque se assumiu que este parâmetro é influenciado pelo volume e a sua variação da contagem total de hemócitos é, maioritariamente, a ele devida. O resultado corrigido mostra uma evolução que acompanha o desenvolvimento dos insectos, ou seja, aumento durante os três primeiros dias e um decréscimo sequencial até ao último dia em *M. unipuncta* enquanto que em *S. littoralis* o seu número diminui menos acentuadamente durante o quarto e quinto dia e depois no sexto e último dia, o seu número retoma os níveis do primeiro dia do estado. A perda de hemócitos no final do estado em *M. unipuncta* é suportada pelos granulócitos e plasmatócitos. As células esféricas mostram variações atenuadas e é provável que o aumento do seu número esteja correlacionado com a sua provável função na metamorfose. Em *S. littoralis* o ligeiro aumento das células de grânulos densos poderá também estar correlacionado com os fenómenos fisiológicos ligados à metamorfose mas a sua função é em todo desconhecida.

A contagem diferencial de hemócitos CDH, por seu lado, permite conhecer que o número total de hemócitos no essencial é devida à contribuição dos plasmatócitos e granulócitos e que as suas variações, ao longo da duração do último estado larvar são semelhantes.

Os estudos efectuados sobre a caracterização morfológica e ultrastrutural dos hemócitos, metodologias de manipulação destas células *in vitro* e evolução da imagem sanguínea permitiram obter resultados muito importantes. Estas observações serão essenciais para os estudos *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, sobre a acção da bactéria e da toxina purificada.

A injeção de *X. nematophila* provoca a morte das lagartas em poucas horas mas, apesar da rapidez com que este fenómeno ocorre, é possível seguir a evolução do hemograma total e diferencial das lagartas parasitadas até, pelo menos, 30 h pós injeção. A alteração observada permite concluir que o número de hemócitos diminui drasticamente e que o exame visual das células coradas

com o azul Trypan mostra que a partir das 20 h pós injeção a maioria das células estão mortas. A contagem diferencial mostra uma diminuição do número de plasmatócitos o que deve estar correlacionado com a função destas células na selagem das feridas. Nos insectos testemunha o seu número é recuperado com o tempo mas nos insectos injectados com a bactéria não ocorre essa hematopoése hemocitária.

O complexo nematobacteriano *S. carpocapsae-X. nematophila* é altamente patogénico para numerosas espécies de insectos e, é um facto bem conhecido, que este complexo é capaz de se evadir ou deprimir as defesas imunitárias dos insectos (Brehélin *et al.*, 1989; Dunphy e Thurston, 1990). No entanto, as formas ou as vias pelas quais esta evasão ou depressão se efectuam não são conhecidas com rigor. Têm sido demonstradas *in vivo* algumas reacções depressivas, desencadeadas pelo complexo, contra as actividades de defesa imunitária dos insectos, tais como: i) supressão dos hemócitos (Dunphy e Thurston, 1990); ii) inibição dos péptidos antibacterianos produzidos pelos insectos (Götz *et al.*, 1981) e iii) supressão da actividade fenoloxidásica (Brehélin *et al.*, 1989; Dunphy e Webster, 1991). A actividade antipéptidos antibacterianos, ou melhor, o desaparecimento dos péptidos antibacterianos da hemolinfa dos insectos, parece ser devida à actividade proteásica desencadeada pela enzima secretada pelo nemátodo (Götz *et al.*, 1981). Contudo, os factores responsáveis pelos outros efeitos de depressão imunitária tardam a ser conhecidos. Durante muito tempo a maior parte dos estudos sobre a patogenicidade do complexo foram elaborados *in vivo*. Este facto não permitiu uma correcta e fácil avaliação e quantificação dos efeitos observados e complicou significativamente a purificação dos eventuais factores envolvidos. Com efeito, até há muito pouco tempo faltavam estudos, até mesmo nos casos das actividades enzimáticas, e nenhum dos factores que poderiam ter sido evidenciadas *in vitro* estava ainda completamente purificado e caracterizado de *S. carpocapsae* e/ou de *X. nematophila* (Kucera e Mracek, 1989; Akhurst e Dunphy, 1993). Esta tendência tem vindo a ser alterada e, recentemente, começaram a aparecer trabalhos nos quais aparece a purificação de lecitinase (Thaler *et al.*, 1998) e de uma protease (Caldas *et al.*, 2002) de

*X. nematophila*. Em *Photorhabdus luminescens*, uma espécie de bactéria simbiote de nemátodos da família Heterorhabditidae, foi também purificada e caracterizada uma protease (Schmidt *et al.*, 1988; Bowen *et al.*, 2000; Thai *et al.*, resultados não publicados).

Os resultados do nosso trabalho mostraram que é possível obter *in vitro* a incubação do complexo simbiote, dos nemátodos axénicos e da bactéria com a consequente produção, nos sobrenadantes dos meios de cultura, de enzimas e de factores de toxicidade contra as células imunocompetentes dos insectos. A estratégia seguida ao longo do trabalho foi, muitas vezes, ditada pelo desenrolar evolutivo normal dos resultados que indicavam o melhor caminho a seguir na pesquisa dos factores de citotoxicidade, sua purificação, caracterização química preliminar e modo de acção.

Numa primeira abordagem identificámos as actividades enzimáticas e citotóxicas presentes nos sobrenadantes de cultura do complexo simbiote e em todas as nossas experiências, as testemunhas mostraram que a bactéria associada aos nemátodos holoxénicos ou monoxénicos era a sua bactéria simbiote natural, *X. nematophila*.

Com efeito, em quaisquer dos meios de cultura utilizados foi possível detectar a presença de proteases, lipases e lecitinases, além de, uma actividade citotóxica contra hemócitos de, pelo menos, quatro espécies de insectos lepidópteros. A tarefa subsequente consistiu em separar cada uma dessas actividades e o recurso à cromatografia líquida de troca aniónica em sistema FPLC foi o caminho seguido.

Pelo presente estudo mostrou-se que, no decurso das incubações *in vitro* do complexo nematobacteriano, estão presentes no meio de cultura vários factores tais como os citotóxicos e de descolamento de hemócitos. Numa primeira observação, a partir dos nossos resultados, parece que os factores com actividade descolamento de hemócitos são produzidos, principalmente pelos nemátodos, no entanto, as bactérias também produzem factores com actividade análoga. Quando se analisam os cromatogramas dos meios de cultura do complexo simbiote com

os provenientes somente da incubação da bactéria em cromatografia de troca aniônica com colunas Mono Q, constata-se que as actividades em causa são eluídas na mesma percentagem de NaCl. Por seu turno, os factores citotóxicos parecem ser produzidos somente pela bactéria, dado que, os meios de cultura onde incubaram os nemátodos axénicos não apresentam qualquer tipo de actividade citotóxica. Para além de tudo isto, mostrou-se que: i) os hemócitos são um dos alvos daqueles factores *in vitro*; ii) aqueles factores podem ser separados um do outro numa simples etapa cromatográfica; iii) aqueles factores podem ser quantificados em função da sua actividade biológica. Também se mostrou que os factores citotóxicos são dependentes do tempo e da dose. Todas estas demonstrações conduziram na senda da purificação e caracterização das moléculas envolvidas. Diferentes estirpes de *X. nematophila* e *P. luminescens* têm mostrado que produzem proteases, lipases e lecitinases aquando em crescimento em meio de cultura líquido (Akhurst, 1980; Bleakley e Nealson, 1988; Boemare e Akhurst, 1988; Schmidt *et al.*, 1988). No presente estudo também se observou que foram produzidas lipases, lecitinases e proteases durante a incubação do complexo nematobacteriano. No entanto, estas actividades enzimáticas não foram recuperadas nas fracções com actividade do tipo C1 e, em particular, a actividade proteásica estava presente nas fracções com efeito de descolamento de hemócitos. As proteases tais como a tripsina são, em geral, usadas para fazer descolar células aderentes às paredes dos recipientes dos meios de cultura. Assim, o efeito de descolamento, detectado nas fracções saídas das cromatografias de troca aniônica, pode ser correlacionado com a actividade proteásica existente nessas mesmas fracções. Por outro lado, como nenhuma das actividades enzimáticas foram detectadas nas fracções citotóxicas do tipo C1 ou  $\alpha$ -Xlis pode concluir-se que esta actividade biológica não está relacionada com as actividades enzimáticas.

É bem conhecido que os LPS libertados pelas bactérias Gram negativas induzem um largo espectro de reacções fisiológicas nos vertebrados. No entanto, estas endotoxinas exercem os seus efeitos biológicos pela estimulação da produção e libertação de mediadores endógenos tais como interleucinas e factores de

necrose tumoral e não pela toxicidade directa sobre as células (Schletter *et al.*, 1995). Nos insectos infectados por *X. nematophila*, os LPS libertados pela bactéria parecem ter um efeito tóxico directo sobre os hemócitos (Dunphy e Webster, 1988). Como este efeito foi observado *in vivo* não é possível compará-lo com o referido no presente trabalho. Para Goldenberg *et al.* (1984), os LPS possuem efeitos tóxicos em hemócitos de lagosta *in vitro* quando usados em concentrações bastante elevadas, por exemplo, 10 mg/mL. Aono *et al.* (1994) observaram que os efeitos citotóxicos induzidos *in vitro* pelos LPS nos hemócitos hialinos e semi-granulares de lagosta só eram observáveis se extractos de hemócitos granulares fossem adicionados à solução de LPS. Por seu lado, para Charalambidis *et al.* (1995) soluções de LPS, em concentrações até 500mg/mL, não possuem efeito citotóxico sobre os hemócitos de insectos *in vitro*. Em todos os nossos ensaios, além de as testemunhas mostrarem possuírem diferentes concentrações de LPS, todos os outros resultados permitiram a conclusão de que os factores responsáveis pela citólise dos hemócitos era de natureza proteica em vez de lipopolissacáridica: i) não se observou actividade lítica com diferentes concentrações de LPS testadas, ii) o teste para a detecção de LPS revelou sistematicamente a sua presença em todas as soluções testadas até mesmo naquelas que não possuíam actividade citotóxica, iii) sensibilidade das fracções activas à temperatura e às proteases.

Os dois factores evidenciados neste estudo, o responsável pela actividade citotóxica e pelo descolamento dos hemócitos, são activos contra as células imunocompetentes de insectos, os hemócitos. Se estes factores são, de facto, produzidos nos insectos no decurso de uma infecção nematobacteriana normal, poderão estar envolvidos no processo infeccioso pela depressão de algumas das reacções de defesa imunitária. Como estas actividades são diferentes uma da outra os seus efeitos imunodepressores devem fazer-se sentir cumulativa e sinergisticamente. As proteínas que lisam os hemócitos ( $\alpha$ -Xlis) poderão ser as responsáveis pelo abaixamento do número das células disponíveis para o desencadear das duas reacções de defesa celular maioritárias, o encapsulamento e a fagocitose. No quadro de uma eventual participação destes factores no

processo patogénico poder-se-á postular que, o factor de descolamento de hemócitos, deve estar envolvido no abaixamento ou supressão da capacidade dos hemócitos em promoverem a adesão entre si impedindo deste modo a formação de cápsulas ao redor dos nemátodos ou nódulos em volta das bactérias. Relembre-se a propósito que os plasmatócitos são as células mais sensíveis a este factor e que, além disto, são as hemócitos maioritariamente envolvidas na formação das cápsulas.

No que respeita aos factores citotóxicos está demonstrado que existe também uma sensibilidade diferencial dos hemócitos sendo os granulócitos as células mais atingidas. Estas células representam os hemócitos com capacidade fagocíticas e são bastante mais sensíveis do que os plasmatócitos.

Dos efeitos dos factores em análise ressalta a forte sugestão de que as moléculas envolvidas apresentam uma especificidade celular cujos modos de acção diferenciais são complementares um do outro, atingindo células responsáveis pelas reacções de defesa celular, e de cujo sinergismo poderá estar o segredo do sucesso do complexo nematobacteriano entomopatogénico.

O seguimento lógico do trabalho conduziu-nos para o estudo de qual dos parceiros da simbiose era o responsável pela produção do factor de descolamento de hemócitos e citotóxico. Os resultados mostraram que os nemátodos axénicos não produzem nenhum dos factores, que a bactéria é capaz de produzir ambos os factores mas que, no caso do descolamento de hemócitos parece existir uma amplificação da sua actividade quando em associação com o nemátodo.

Por conseguinte, o modelo complexo simbiote foi abandonado e passou a realizar-se o trabalho somente com recurso à bactéria. Esta decisão foi tomada também pela adição de outros resultados muito relevantes que indiciaram inequivocamente a capacidade de a bactéria poder desencadear sozinha o processo de entomopatogenicidade nos ensaios *in vivo*, nos quais o nemátodo foi substituído por uma seringa. De facto, as bactérias injectadas no hemocélio dos insectos matam as lagartas em poucas horas e parece que não são reconhecidas pelo sistema de defesa dos insectos.

Muitas estirpes selvagens de *Xenorhabdus* desenvolvem fortes actividades citolíticas contra hemócitos de insectos. Somente *X. poinarii*, a qual é considerada como sendo uma espécie fracamente patogénica contra lepidópteros, com a dose letal a rondar 50% no patamar de 1000 a 10000 bactérias (Akhurst, 1986), sendo conhecida como uma espécie não produtora de citolisinas. Assim, existe uma correlação positiva entre a presença de citolisinas activas contra imunócitos de insectos e a virulência de *Xenorhabdus*.

A pesquisa das actividades citotóxicas/hemolíticas nos meios de cultura de *X. nematophila* permitiram distinguir duas actividades contra os imunócitos de insectos uma das quais está sob o controlo do operão flagelar *flhD*, (Givaudan e Lanois, 2000). Esta actividade citotóxica dependente do *flhD* é, também, hemolítica contra hemácias de carneiro mas não contra as de coelho e demais características como será abaixo discutido.

Além do mais, demonstrou-se previamente que um mutante negativo *flhD* o qual tinha perdido a sua actividade hemolítica contra hemácias de carneiro mostraram um fenótipo de virulência atenuada contra *S. littoralis* (Givaudan e Lanois, 2000). Este estudo revelou que este mutante era incapaz de produzir a actividade citolítica precoce quando testada contra hemácias de carneiro ou hemócitos de insectos, no entanto, demonstrou uma actividade contra hemócitos durante os estados tardios da fase estacionária de crescimento bacteriano. Estes resultados poderão explicar porque é que o mutante *flhD* negativo se mantém virulento e porque é que os insectos injectados com a estirpe mutante possuem um tempo letal mais longo. Além do mais, (i) o mutante *flhD* negativo de *X. nematophila* o qual tinha perdido a sua capacidade para produzir a actividade hemolítica lábil ao calor continuou a ser um produtor das enzimas lecitinase e proteases (Givaudan e Lanois, 2000), (ii) que a variante de fase II de *X. nematophila*, a qual desenvolve uma enorme actividade lipásica (tendo como substrato Tween) maior do que o tipo selvagem (Givaudan e Lanois, 2000) é um não produtor de hemolisina, e (iii) que a adição de EGTA (um inibidor de metaloproteases) ao meio de cultura não afecta a actividade citolítica e hemolítica (Brillard *et al.*, 2001).

A toxicidade das bactérias entomopatogénicas para os hemócitos de insectos já foi descrita para *Pseudomonas aeruginosa* (Horohov e Dunn, 1983) e para *X. nematophila* (Dunphy e Webster, 1984; Seryczynska, 1971; Seryczynska *et al.*, 1974). Contudo, estes ensaios *in vivo* foram inadequados para distinguir entre citotoxicidade directa dos factores contra hemócitos (citotoxinas) ou uma acção lítica envolvendo a fisiologia geral do hospedeiro como acontece com os LPS nos mamíferos (Schletter *et al.*, 1995). Os ensaios *in vitro* usando culturas de células de insectos (Sf-9 e mbn-2) e *Bacillus thuringiensis* como agente patogénico mostraram que a bactéria (estirpe Bt 13) ou os seus sobrenadantes de cultura podiam matar as células de insectos (Zhang *et al.*, 1995).

No presente estudo desenvolvemos metodologias de ensaios experimentais *in vitro*, mas em vez de usarmos linhagens celulares, deitámos mão de monocamadas de hemócitos de insectos. Usando este ensaio *in vitro*, encontrámos duas actividades citolíticas diferentes sobre as células imunocompetentes de insectos nos sobrenadantes de cultura de *X. nematophila* F1/1. Ambas as actividades encontradas nos extractos C1 e C2 foram estudadas. A actividade citolítica do extracto C1 foi (i) a mais precoce, dado que aparece quando a cultura bacteriana está a atingir a fase estacionária; (ii) é dependente do operão *flhD*; (iii) é independente do cálcio; e (iv) é lábil ao calor. Estas características foram também aquelas apresentadas para a actividade hemolítica evidenciada contra hemácias de carneiro, sugerindo que o(s) mesmo(s) factor(es) eram responsáveis pela hemólise das suspensões de hemácias de carneiro e pela citólise dos hemócitos de insectos. Em contraste, a segunda actividade citolítica (i) apareceu mais tarde na fase estacionária, (ii) era independente do operão *flhD*, (iii) era independente do cálcio, e (iv) era resistente ao calor, ou seja, possuiam as quatro características atribuídas à actividade hemolítica contra as suspensões de hemácias de coelho. Em adição às suas diferenças na lise de hemácias, os extractos C1 e C2 também mostraram grandes diferenças na especificidade em relação aos hemócitos de insectos. No conjunto dos três tipos de hemócitos mais importantes da hemolinfa de *S. littoralis* e *M. unipuncta* foram os Granulócitos as células mais sensíveis ao extracto C1 em relação Plasmatócitos, tendo sido as

Células Esféricas as células mais resistentes. Em contraste, o extracto C2 foi principalmente citotóxico para os Plasmatócitos e Células esféricas enquanto que os Granulócitos foram os hemócitos mais resistentes. A especificidade do extracto C1 para os diferentes tipos de hemócitos de insecto e as suas características bioquímicas foram exactamente aquelas evidenciadas para o factor citotóxico presente no meio de incubação do complexo nematobacteriano *Steinernema-Xenorhabdus*. O presente trabalho mostra que o factor citotóxico encontrado no complexo nematobacteriano é da responsabilidade da bactéria e não do nemátodo.

Finalmente, C1 e C2 também exibem diferenças nos modos de acção dos efeitos citotóxicos contra imunócitos de insectos. Cedo durante a incubação em presença do extracto C1, os hemócitos desenvolvem grandes e numerosos vacúolos e então aparecem como células túrgidas. Por seu turno, a incubação com o extracto C2 induz uma plasmólise dos hemócitos. Os vacúolos induzidos pelo extracto C1 observados nos Plasmatócitos e Granulócitos são dilatações do retículo endoplásmico. Vacúolos similares podem ser observados em células de mamíferos tratadas pela aerolisina formadora de poros de *Aeromonas hydrophila* (Abrami *et al.*, 1998b). No entanto, não ocorre citólise após várias horas de incubação com a aerolisina formadora de poros (Abrami *et al.*, 2000), enquanto que a vacuolização induzida por C1 provoca a lise hemocitária em poucos minutos. Parece ser claro que ambas as actividades citolíticas de *X. nematophila* são distintas uma da outra e que a sua produção é independentemente regulada. Contudo, a natureza das moléculas envolvidas na citólise e o mecanismo de acção contra as células alvo permanece, no essencial, desconhecido sendo este o primeiro trabalho que começa a tentar fazer luz sobre esta matéria.

Os sobrenadantes das culturas de *Xenorhabdus* são ricos em proteases e enzimas lipolíticas (Boemare e Akhurst, 1988) as quais podem contar para a actividade hemolítica por proteólise ou digestão fosfolipídica. Tomados no seu conjunto, todos estes resultados conduzem à conclusão de que as actividades hemolíticas e citolíticas produzidas por *X. nematophila* e descritas neste estudo não estão relacionadas com actividades do tipo enzimático. De resto, mostrou-se

que não ocorre lise a 4° C com qualquer dos extractos citolíticos. Estes dados sugerem que este processo lítico dependente da temperatura necessita de energia para se concretizar. A actividade do tipo detergente também tem sido descrita como um fenómeno capaz de induzir a hemólise (Rowe e Welch, 1994). No entanto, este mecanismo é usualmente eficaz a baixas temperaturas, ao contrário do que acontece com as duas actividades citolíticas de *X. nematophila*. Estes resultados sugerem que estarão envolvidas toxinas formadoras de poros nos processos líticos de ambas as actividades de *X. nematophila* como tem sido descrito para muitas bactérias (Leippe, 1995).

A sensibilidade à tripsina e ao calor indicam que é necessário um componente proteico para que ocorra a actividade citolítica. Os resultados obtidos nos ensaios de electrofisiologia estão também de acordo com a presença de uma molécula formadora de poros. Em contraste, a resistência à tripsina e ao calor do extracto C2 pode ser confundida com as características dos LPS, os quais têm sido apontados como tóxicos *in vivo* para os hemócitos de *G. mellonella* (Dunphy e Webster, 1988a). No entanto, como já foi assinalado, os resultados consistentemente apresentados, no presente trabalho, indicam que os LPS são inactivos contra hemácias e hemócitos de insectos, permitindo a conclusão de que não estão envolvidos na actividade biológica observada com os extractos citotóxicos e estáveis ao calor do tipo C2. Finalmente, os factores activos nos extractos C2 podem ligar-se às membranas das hemácias de coelho a 4° C e então provocar a sua actividade hemolítica a 37° C, tal como fazem a maioria das toxinas bacterianas formadoras de poros (Menestrina *et al.*, 1994). Uma citotoxina formadora de poros isolada do parasita protozoário *Entamoeba histolytica* é um polipéptido resistente ao calor e à degradação proteolítica que forma canais nas membranas das células alvo (Leippe, 1995). Isto sugere que o factor activo em C2 é também uma toxina formadora de poros.

Ambas as actividades citolíticas apresentadas neste estudo são capazes de destruir as células imunocompetentes dos insectos. Se estes factores bacterianos forem produzidos nos insectos durante a infecção com o complexo nematobacteriano, poderão estar envolvidos no processo pela depressão de

algumas das reacções de defesa imunitária. Dado que para os dois factores os seus alvos celulares são diferentes, a depressão imunitária deveria poder ser conseguida pela diminuição do número de células disponíveis para efectuarem as duas maiores reacções de defesa celular, formação de cápsulas e nódulos envolvendo os plasmatócitos e a fagocitose mediada pelos granulócitos. Trabalho adicional é necessário para se construir um mutante deficiente em ambas as actividades citolíticas, de modo a clarificar o envolvimento *in vivo* da citólise contra as defesas celulares dos insectos, durante a interacção patogénica com *Xenorhabdus*.

A partir dos extractos brutos de cultura bacteriana os estudos bioquímicos resultaram na purificação, de uma toxina proteica de 10.8 kDa, denominada,  $\alpha$ -Xenorhabdolisinina, responsável por esta actividade dependente do operão *flhD*. Tanto o meio de cultura como a toxina purificada possuem a mesma sensibilidade ao calor e à tripsina, e apresentam a mesma especificidade contra os imunócitos de insecto e a mesma actividade hemolítica contra hemácias de carneiro, sendo as hemácias de coelho insensíveis. Também foi evidenciado pelo presente trabalho que esta citolisina também era capaz de aumentar o número de hemócitos reactivos ao teste TUNEL de despistagem da apoptose, após uma longa incubação a baixas doses de  $\alpha$ -Xlis. Não se observa o aumento de células marcadas com o TUNEL quando a citolisina foi previamente incubada a 60° C (30 min) antes de ser colocada em contacto com as células. Após a incubação das membranas das hemácias de carneiro, com os extractos brutos dos meios de cultura *X. nematophila* ou com as soluções da citolisina purificada, a hemólise assim como a citotoxicidade contra os hemócitos e a marcação TUNEL desapareciam. Em presença destes resultados concluiu-se que a molécula purificada era responsável por ambas as actividades, hemólise e citotoxicidade contra hemócitos e com o conseqüente aumento do número de células marcadas pelo TUNEL. As curvas de titulação mostraram que não existe relação linear entre a concentração da hemolisina e a libertação de hemoglobina (densidade óptica). Este facto sugere uma afinidade de ligação dependente da concentração da toxina ao seu alvo membranar, tal qual foi demonstrado para  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus*

(Hildebrand *et al.* 1991). Alternativamente, podem ocorrer outras interações entre as moléculas da citotoxina e diferentes cinéticas ou modos de polimerização dependentes da sua concentração.

Tanto quanto se julga saber, o presente trabalho constitui o primeiro relato da purificação de uma citotoxina libertada por uma bactéria entomopatogénica e que apresenta actividade contra imunócitos de insectos, capazes de lisar os hemócitos, impedindo as reacções de defesa celular.

O desaparecimento total de actividade citotóxica após incubação com as membranas das hemácias de carneiro e os resultados dos ensaios de protecção osmótica e “patch-clamp” mostraram que a toxicidade da  $\alpha$ -Xlis foi primeiramente direccionada para a membrana celular. Para além disto, estes resultados foram consistentes com os obtidos com as incubações de longa duração (até 24 horas) de  $\alpha$ -Xlis com hemácias de carneiro e os das incubações com o aumento da concentração das células alvo. Nestes ensaios mostrou-se que a quantidade de hemólise não aumenta a partir de duas horas de incubação e que a percentagem de hemólise diminui quando a concentração das células alvo aumentam. Com base nestes resultados conclui-se que a uma vez fixada à membrana celular a  $\alpha$ -Xlis não era reciclada de modo a poder reagir com células alvo múltiplas. De acordo com Rowe e Welch (1994) estes dados mostram que a  $\alpha$ -Xlis parece ser uma toxina formadora de poros e não uma molécula lítica possuidora de uma actividade enzimática.

Os resultados dos estudos de “patch-clamp” aqui mencionados são consistentes com uma tal actividade formadora de poros. Não é possível negar a possibilidade de que a  $\alpha$ -Xlis poderá activar canais endógenos ao invés de formar novos poros. Contudo, os resultados de protecção osmótica são consistentes com a formação de poros pela  $\alpha$ -Xlis. Além do mais, estes resultados mostraram que a dimensão dos poros aumenta com a concentração da toxina como já tinha sido observado para diferentes outras moléculas formadoras de poros tais como as do complemento (dimensões dos poros entre 0.7 to 15nm; Ramm e Mayer, 1980) ou a toxina de *E. coli* (0.6 até 1.3nm; Moayeri e Welch, 1994) e outras toxinas do tipo

RTX (Lally *et al.*, 1999). A proteção total da citólise dos macrófagos de insectos foi obtida com PEG 4,000 (raio do poro: 1.9 nm; Scherrer e Gerhardt, 1971) qualquer que tenha sido a diluições da  $\alpha$ -Xlis no entanto a proteção das hemácias de carneiro foi somente obtida com PEG 6,000 (raio do poro: 2.9 nm) para as maiores concentrações de  $\alpha$ -Xlis. Estes resultados sugerem que a dimensão máxima dos poros formados na membrana celular das hemácias de carneiro poderão ser maiores do que aqueles formados pela mesma hemolisina/citolisina nos macrófagos de insectos. A maior dimensão dos poros formados nas hemácias em relação aos das células nucleadas já tinha sido relatada para a  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus* (Jonas *et al.*, 1994; Walev *et al.*, 1995) e para ShlA de *S. marcescens* (Hertle *et al.*, 1999). Apesar disto, a causa para a variação na dimensão dos poros é desconhecida. Finalmente, os resultados da proteção osmótica permitiu concluir que a  $\alpha$ -Xlis actua através de uma lise do tipo colóide-osmótica (Young e Cohn, 1987). Na lise colóide-osmótica, os canais transmembranares só permitem a passagem livre a iões e a pequenas moléculas através da membrana celular. Assim, a pressão osmótica gerada pela elevada concentração das macromoléculas no interior da célula causam um influxo de água que conduz à sua turgescência e, por vezes, à lise por rebentamento.

A lise celular é o efeito mais óbvio da  $\alpha$ -Xlis de *X. nematophila* sobre os hemócitos. No entanto, em primeiro lugar, os hemócitos de insecto apresentam uma extensiva vacuolização do citoplasma. Apesar de não muito comum no processo de toxicidade celular, a vacuolização celular foi descrita para diferentes e não relacionadas toxinas bacterianas. Nos mamíferos, a toxina VacA de *Helicobacter pylori* (Papini *et al.*, 1994), aerolisina de *Aeromonas hydrophila* (Abrami *et al.*, 1998 a,b), a hemolisina ShlA de *Serratia marcescens* (Hertle *et al.*, 1999) e a hemolisina HlyA de *Vibrio cholerae* (Figueroa-Arredondo *et al.*, 2001) causam vacuolização em vários tipos celulares *in vitro*. Contudo, só com ShlA e HlyA é que fora observados vacuolização celular seguida de lise de células de mamíferos em cultura, tal como nas nossas experiências com  $\alpha$ -Xlis e hemócitos de insectos. Como as VacA, aerolisina, ShlA e HlyA são também responsáveis pela vacuolização de diferentes organitos celulares, foram

conduzidas dois tipos de experiências para caracterizar qual o organito celular estava a ser sujeito a vacuolização pela  $\alpha$ -Xlis. O vermelho neutro é um corante supravital do sistema endossomal/lisossomal (Bloom e Fawcett, 1975). Os dados obtidos com o vermelho neutro sugeriram que os vacúolos observados nos hemócitos após incubação com a  $\alpha$ -Xlis não pertenciam ao sistema endossomal/lisossomal, os quais estão em contraste com as conclusões dos estudos efectuados em células de mamíferos com VacA, ShlA ou HlyA. O exame, em microscopia electrónica, dos hemócitos tratados com a  $\alpha$ -Xlis, permitiram concluir que os vacúolos eram de facto as cisternas dilatadas do retículo endoplásmico rugoso. A vacuolização do RER por toxinas bacterianas só foi referida uma única vez na bibliografia para as células de mamíferos sendo esta a primeira vez que uma tal acção é referida para células de insectos. Após incubação de células BHK com a aerolisina de *A. hydrophila*, Abrami *et al.* (1998 b) descreveram vacuolização extensiva do retículo endoplásmico. Este tipo de vacuolização é de primeira importância no estudo da virulência bacteriana mas não é um fenómeno completamente compreendido. Como *X. nematophila* não é um agente patogénico humano, parece poder ser um bom candidato a modelo biológico fácil de ser usado no estudo da vacuolização do RER despoletada por uma toxina bacteriana.

Previamente à vacuolização do RER desencadeada pela aerolisina, Abrami *et al.* (1998 a,b) mostraram que o primeiro alvo da toxina era a membrana celular onde eram formados canais selectivos para pequenos iões. No presente estudo foi, também, demonstrado que a membrana celular dos hemócitos de insectos era o primeiro alvo da  $\alpha$ -Xlis de *X. nematophila*. Deste modo, a eventual acção desta toxina na permeabilidade iónica da membrana, foi estudada electrofisiologicamente em ensaios de espectrofotométricos e em “patch-clamp”.

A espectrofotometria das modificações da concentração do cálcio intracelular permitiu concluir que a entrada deste catião se processa como consequência da lise celular, não estando envolvido em nenhum fenómeno detectável de indução dessa mesma lise.

Por seu lado, os resultados dos estudos de "patch-clamp" mostraram que o primeiro efeito da  $\alpha$ -Xlis na membrana celular dos imunócitos de insectos foi um aumento da permeabilidade iónica, principalmente para catiões. Deste modo, a  $\alpha$ -Xlis tanto pode fazer poros de grandes dimensões como também canais de pequeno diâmetro específicos para catiões monovalentes. As modificações à permeabilidade iónica produzidas por toxinas bacterianas em células eucariótas está muito bem documentada na bibliografia. Nas células HeLa a toxina VacA de *Helicobacter pylori* (Szabo *et al.*, 1999) e nas células de insectos da linhagem SF-9 a  $\delta$ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* (Schwartz *et al.* 1991) são capazes de formar canais aniónicos selectivos. Canais com fraca discriminação entre os diferentes catiões são formados nos macrófagos humanos pela HlyA de *E. coli* (Menestrina *et al.*, 1996). A  $\alpha$ -Xlis de *X. nematophila* foi mais específica dado que foi capaz de criar canais muito mais selectivos para os catiões monovalentes, de um modo similar ao da citolisina de *S. aureus* (Jonas *et al.*, 1994). No decurso das nossas experiências, a inibição da "correntes" por moléculas bloqueadoras específicas dos canais potássio, TEA ou TBuA, mostraram que os canais catiónicos, abertos ou criados pela  $\alpha$ -Xlis, podem ser bastante específicos para o potássio assim como já tinha sido demonstrado para a aerolisina de *Aeromonas hydrophila* em células de mamíferos da linhagem BHK (Abrami *et al.*, 1998 b). O bloqueamento pelo TBuA também inibiu a vacuolização do RER e a lise celular, demonstrando que a perturbação da permeabilidade ao potássio induzida pela  $\alpha$ -Xlis pode ser suficiente para que as células alvo litem. A maior eficiência do TBuA sobre o TEA podem ser relacionadas com a sua maior dimensão molecular a qual permite um melhor bloqueio da abertura dos canais potássio (del Camino *et al.*, 2000). De um modo semelhante ao que ocorreu para os ensaios conduzidos em presença da toxina VacA em células HeLa (Szabo *et al.*, 1999), a inibição da lise dos macrófagos de insectos por moléculas bloqueadoras foi mais eficaz a doses mais fracas  $\alpha$ -Xlis.

A continuação dos trabalhos conduziu ao estudo do efeito dos fosfolípidos membranares sobre as actividades citotóxica e hemolítica. Nos ensaios recentemente desenvolvidos incubaram-se emulsões de fosfolípidos com soluções

de  $\alpha$ -Xlis com actividade biológica conhecida. Depois testaram-se as actividades citotóxicas e hemolíticas remanescentes. Foram obtidos resultados muito interessantes sobre o ponto de vista dos eventuais receptores membranares da citolisina. Quando se testaram alguns dos fosfolípidos membranares maioritários sobre a actividade da  $\alpha$ -Xlis verificou-se que os fosfolípidos neutros (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, colesterol e esfingomiéline) não produziam nenhum efeito sobre a actividade da molécula em análise. Por seu lado, os fosfolípidos negativos (fosfatidilserina e fosfatidilinositol) inibiam completamente a actividade citotóxica e hemolítica. De notar que estes fosfolípidos se encontram situados no hemifolheto interno das bicamadas lipídicas que constituem as membranas celulares. Acresce que, nos estudos electrofisiológicos, quando em configuração "inside-out" a cinética da actividade de formação de poros era muito mais rápida do que na configuração "on-cell". Na primeira configuração a  $\alpha$ -Xlis estava em contacto com o hemifolheto interno, por conseguinte, com os seus eventuais lípidos receptores em acesso directo. Além disto, na segunda configuração, a abertura dos canais e a continuada exposição à acção da toxina, forneceu resultados que suportam a hipótese e sugerem que a molécula é, primeiramente, responsável pela formação de canais iónicos. Depois estes canais vão apresentando diâmetros cada vez maiores que acabam por deixar passar a própria toxina no interior da célula. Uma vez no citoplasma, o hemifolheto interno esta acessível à toxina e assiste-se, então, à rápida perda da condutância - capacitância celular. Isto é o resultado da abertura de novos canais em regiões do plasmalema exteriores à área membrana delimitadas pelo eléctrodo aquando do contacto hermético. O resultado é a pura e simples perda do sinal com a consequente lise e rebentamento da célula. No futuro poder-se-á explorar a hipótese da inversão da fosfatidilserina, do hemifolheto membrana interno para o externo, como sinal precoce de indução da apoptose e o seu significado enquanto fosfolípido receptor da  $\alpha$ -Xlis.

Uma outra das hipóteses que poderão ser estudadas no futuro é a de que a  $\alpha$ -Xlis interage primeiramente com um receptor externo, eventualmente, ligado ao fosfatidilinositol. A dinâmica da formação do poro postula-se idêntica ao que

está descrito para outras citotoxinas formadoras de poros. Dependente da quantidade de toxina disponível assim o diâmetro do poro é mais ou menos importante. Nas condições em que o poro é suficientemente largo a  $\alpha$ -Xlis acaba por difundir-se para o interior da célula e, uma vez no citoplasma, fica em contacto directo com ambos os fosfolípidos específicos e a acção de abertura de novos canais, desta vez conduzida do interior da célula, é mais importante levando à rápida e inevitável lise e morte celular.

Em geral, as toxinas membranares possuem receptores proteicos de elevada afinidade. Contudo, em muitos casos as toxinas usam lípidos como receptores de baixa afinidade. Os lípidos encontram-se abundantemente disponíveis em todas as membranas de tipos celulares diferentes e não estão sujeitos a mutações. Esta estratégia evita a neutralização da toxina por alteração do receptor, (Menestrina *et al.*, 1994).

Em conclusão, a membrana celular é o primeiro alvo da  $\alpha$ -Xenorhabdolisina a toxina purificada dos meios de cultura de *X. nematophila*. Os efeitos nos macrófagos de insectos depende em grande parte da concentração de  $\alpha$ -Xlis. Nas concentrações mais elevadas a toxina actua como uma molécula formadora de poros em três etapas principais. Primeiramente, modifica a permeabilidade da membrana celular a pequenos catiões, principalmente o potássio, mas não destrói a sua integridade. Numa segunda etapa, a vacuolização dos hemócitos granulares (e outros hemócitos de insectos), ocorre como consequência das modificações da actividade dos canais potássio porque o bloqueio destes canais pelo TBuA inibe a vacuolização celular.

Interessante é o facto de que tanto a aerolisina (Abrami *et al.*, 1998 a,b) como a  $\alpha$ -Xlis, ambas são capazes de alterar a permeabilidade ao potássio e despoletam a vacuolização do RER. Numa terceira e última etapa, quando o desequilíbrio osmótico se sobrepõe à homeostasia celular, um influxo incontrolado de água provoca a turgescência celular e eventualmente membrana rompe. Além disto, como foi sugerido pelos resultados dos ensaios da protecção osmótica, a

dimensão dos poros aumenta na razão directa com a concentração da toxina, permitindo o tráfego de grandes moléculas e a lise das células.

A muito baixas concentrações de  $\alpha$ -Xlis, as incubações prolongadas das monocamadas de hemócitos provocam o aumento das células marcadas pela coloração TUNEL, sugerindo que a apoptose pode ser desencadeada nestas células. Interessante, é o facto de que o efluxo de iões potássio foi evidenciado como sendo um passo precoce que conduz ao aparecimento da apoptose nos neurónios de ratinho (Yu *et al.* 1997). Um aspecto muito importante no presente estudo é o que abre a possibilidade de se testar a hipótese de que doses muito baixas de  $\alpha$ -Xlis, as quais não são capazes de induzir a necrose celular, podem por seu turno, desencadear a apoptose e se a vacuolização do RER estará envolvida neste processo.

Relembre-se que o facto de não ser possível de efectuar a detecção da  $\alpha$ -Xlis *in vivo*, na hemolinfa dos insectos injectados com a bactéria, sustentam em absoluto aquela possibilidade. Com efeito, parece adquirido que a actividade citotóxica não é detectada porque a molécula, à medida que é produzida mesmo em doses muito baixas, interage de imediato com as membranas celulares. Esta interacção tem como efeito a abertura de canais iónicos, alteração da capacidade de regulação homeostática e, muito provavelmente, a indução da apoptose. Além disto, as bactérias injectadas na cavidade geral das lagartas intervêm, efectivamente, ao nível da depleção dos hemócitos, dado que, o seu número diminui gradualmente até à morte dos insectos o que acontece até às 30 h pós-injecção. Por seu turno, a observação microscópica dos hemócitos mostra que o seu estado se vai deteriorando com o tempo. Por volta das 24-27 horas os hemócitos são maioritariamente células mortas.

## **Discussão Geral e Conclusão**

O desenvolvimento das tecnologias de sequenciação tem feito com que os genomas dos organismos sejam conhecidos cada vez melhor, tendo sido alguns deles sequenciados na sua totalidade. Entrámos, por conseguinte, na era dita "pós-genómica", essencialmente implicada na procura de funções para os genes identificados pelas técnicas de biologia molecular. Neste contexto é evidente que os estudos implicados sobre os fenómenos fisiológicos nos quais as proteínas interventoras são identificadas, representam uma importância capital. No presente trabalho identificaram-se certas reacções características das relações hóspede-patógeno entre um insecto e uma bactéria, analisou-se uma dessas reacções, purificou-se e caracterizou-se a proteína principalmente implicada nesta relação.

A bactéria *Xenorhabdus nematophila* (*Enterobacteriaceae*) faz parte de um complexo nematobacteriano largamente utilizado em luta biológica integrada contra os insectos pragas agrícolas. A forma livre do nemátodo (larva L3 de *Steinernema carpocapsae*) presente no solo é capaz de penetrar na cavidade luminal do tubo digestivo e daí invadir o hemocélio dos insectos onde, tanto os nemátodos como as bactérias, efectuem vários ciclos de desenvolvimento. Entretanto o complexo nematobacteriano provoca a morte dos insectos e quando o "meio de cultura insecto" se encontra exaurido, novas formas livres do nemátodo se escapam do cadáver para o meio ambiente onde continuarão a sua busca por novas presas.

A morte dos insectos não ocorre de imediato e, em média, estes ainda se encontram vivos durante 48-72 horas pós-penetração. Contudo existem casos em que a morte pode ocorrer mais cedo entre 24-36 horas pós-penetração. Em qualquer dos casos, é evidente que durante aqueles lapsos de tempo o nemátodo e a bactéria devem escapar às poderosas reacções de defesa imunitária que o insecto pode activar. Presentemente, está definitivamente estabelecido que a bactéria isolada provoca a morte do insecto a partir do momento em que ela é injectada na cavidade geral e é, portanto, capaz, sozinha, de escapar às reacções imunitárias. No presente trabalho, interessámo-nos às reacções que a bactéria pode activar para induzir uma imunodepressão. A nossa hipótese inicial era a de

que as células imunocompetentes dos insectos, os hemócitos, poderiam ser alvo de factores de patogenicidade expressos pela bactéria. Por conseguinte, para testar esta hipótese, foi necessário, primeiro do que tudo, conhecer muito bem os hemócitos, células alvo potenciais, depois desenvolver e melhorar os utensílios de trabalho que nos permitissem estudar eventuais factores imunodepressores activos contra estas células. Num segundo tempo evidenciámos a presença de certas moléculas responsáveis e caracterizámos os seus efeitos sobre os hemócitos. Uma dessas moléculas foi purificada e analisado o seu modo de acção sobre as células alvo.

\* Os hemócitos presentes nas diferentes espécies de lepidópteros foram estudados sob o plano morfológico e funcional. Mostramos que nestes insectos se pode encontrar uma unidade nas características morfológicas dos diferentes tipos hemocitários postos em evidência, assim como, das respectivas funções a cargo de cada um desses tipos. Apesar de não existir unanimidade, pode ser encontrada uma terminologia mínima utilizada para os designar as diferentes categorias de hemócitos. No conjunto da classe dos insectos, principalmente, na ordem dos lepidópteros, nas suas numerosas espécies dentro dos mesmos géneros e mesmo entre famílias muito diferentes, encontram-se vários tipos de hemócitos muito bem definidos. Neste vasto conjunto de espécies estudadas, a reacção da fagocitose é essencialmente executada pelo tipo Granulócito (Gr) o qual pode ser equiparado aos macrófagos dos mamíferos. No que concerne aos lepidópteros, mostrámos que tanto nas espécies estudadas no presente trabalho como naquelas descritas na literatura, os Gr podem ser caracterizados pela presença de um retículo endoplásmico muito desenvolvido e também pela existência de numerosas inclusões de tipos diferentes. Duas dessas inclusões são particularmente activas na fagocitose. Tratam-se por um lado de inclusões com microtúbulos internos, que são libertados pela célula aquando do contacto com um corpo estranho, antes da fagocitose propriamente dita. Por outro lado, as inclusões polimórficas de conteúdo heterogéneo são fagolisossomas e, por conseguinte, directamente ligados à fagocitose. Estes granulócitos aparecem então como os hemócitos prioritariamente implicados nas reacções de imunidade

celular porque são eles que podem fagocitar as bactérias presentes na hemolinfa. Um outro tipo hemocitário está igualmente implicado, nos lepidópteros, nas reacções contra as bactérias. Tratam-se dos Plasmatócitos (Pl), que na formação dos nódulos. Estas estruturas desenvolvem-se ao redor dos focos de infecção que eles isolam do resto do corpo do insecto. Tanto nas espécies que estudámos como em toda a Ordem Lepidoptera, a formação dos nódulos é reconhecida como a principal função dos Plasmatócitos.

Para poderem desenvolver-se no interior do insecto é necessário que as bactérias patogénicas escapem à acção destas células, Gr e Pl. No quadro do complexo nematobacteriano *Steinernema-Xenorhabdus* e, principalmente, da parte das bactérias *X. nematophila*, foi muito tentadora a possibilidade de investigar sobre uma eventual acção sobre estes tipos de hemócitos.

\* A pesquisa de tais factores citotóxicos foi realizada em dois tempos.

Primeiro, mostrámos que a nossa hipótese de partida era boa porque no meio de incubação do complexo nematobacteriano pudémos evidenciar vários factores tóxicos activos contra os hemócitos. É necessário precisar que as actividades destes factores são inteiramente novas e que jamais a sua existência tinha sido suspeitada. Foram detectados dois tipos de actividade:

- Temos, em primeiro lugar, a actividade de descolamento de hemócitos, ligada à existência de uma protease, que afecta essencialmente os Plasmatócitos. Se esta actividade estiver presente aquando de uma natural do insecto, é evidente que ela deverá consideravelmente atrasar a actividade imunitária contra o complexo nematobacteriano pelo impedimento da formação das cápsulas e dos nódulos.

- Em segundo lugar, mostrámos que o meio de incubação do complexo apresenta também uma actividade citotóxica contra diferentes tipos de hemócitos. Esta citotoxicidade foi reencontrada no meio onde só foi cultivada a bactéria. Mostrámos que, pelo menos, dois factores são responsáveis por este tipo de actividade e que são sintetizados e secretados em momentos bem particulares

do crescimento bacteriano. Estes factores citotóxicos, que possuem igualmente actividades hemolíticas, apresentam uma certa especificidade de acção, não sendo todos os hemócitos sensíveis da mesma maneira a cada um destes factores. Foi assim que o factor citolítico que primeiro aparece, o qual foi chamado alfa-Xenorhabdolisina ( $\alpha$ -Xlis) é uma hemolisina activa contra as hemácias de carneiro e, igualmente contra as hemácias de vaca, porco e cabra. Contrariamente, as hemácias de coelho ou as humanas são-lhe totalmente insensíveis. Dentro dos hemócitos são essencialmente os Granulócitos as células afectadas por este factor. O segundo factor citolítico aparece na cultura num momento em que o primeiro factor quase que desapareceu. Este segundo factor é activo contra as hemácias de coelho e inactivo contra as hemácias de carneiro, o que permite distingui-lo facilmente do precedente. Além disto, são os Plasmatócitos as células que lhe são mais sensíveis.

Por conseguinte, é notório que são os dois tipos de hemócitos, implicados nas duas principais reacções imunitárias de defesa celular antibacteriana, os alvos dos factores tóxicos produzidos pela bactéria. Se estes factores forem produzidos no insecto este facto poderá totalmente suprimir aquelas reacções. Com efeito, a reacção de defesa celular mais rápida, a fagocitose, não se pode desencadear porque os Granulócitos (macrófagos) foram debilitados ou destruídos pelo primeiro factor. Quando a reacção imunitária se desenrola normalmente no insecto, a fagocitose do agente invasor é, em geral, seguido pela formação de nódulos que isolam tanto as bactérias como os macrófagos que, eventualmente, tenham sido destruídos pelas bactérias. A formação dos nódulos pode ser comparada com a reacção de encapsulamento, sendo as duas realizadas principalmente pelos Plasmatócitos. No seguimento da acção do segundo factor citotóxico bacteriano, esta reacção de nodulação também não poderá ser desencadeada porque os Plasmatócitos foram, por sua vez, debilitados ou destruídos. Assim, os factores citotóxicos que evidenciámos e que são secretados por *X. nematophila*, podem suprimir as duas reacções celulares mais eficazes e mais rápidas contra as bactérias.

Este importante resultado permite melhor compreender certos aspectos da patologia desenvolvida por *X. nematophila* no insecto. Ele mostra que a bactéria é capaz de evitar e depois deprimir o sistema imunitário do seu hospedeiro para realizar a colonização do meio intrahemocélio. Além disto, o conhecimento do modo de acção destas citotoxinas bacterianas sobre as células eucariótas poderá desembocar na utilização destes factores em diferentes domínios tais como os da luta insecticida, os do conhecimento de certas vias fisiológicas da célula e, eventualmente, os da saúde humana ou animal. Em conformidade com os resultados prometedores decidimos empreender novas vias de investigação sobre o modo de acção destes factores citotóxicos. Escolhemos o factor citotóxico activo principalmente sobre os macrófagos. Com efeito, nas relações hóspede-patógeno que estudamos, a perturbação da fagocitose pareceu-nos mais importante do que a inibição da nodulação e encapsulamento. Por conseguinte, o nosso trabalho seguiu na pesquisa do modo de acção do factor alfa-Xenorhabdolisina sobre os macrófagos de insecto.

\* Em termos estratégicos e científicos convinha muito, em primeiro lugar, purificar este factor e caracterizá-lo no plano bioquímico. Esta tarefa obrigou-nos a conceder-lhe um tempo enorme pela seguinte razão: no decurso da purificação constatou-se que, de facto, a molécula era uma toxina. Ora uma das características das toxinas é a de agirem a concentrações muito baixas que são, por vezes, na ordem de  $10^{-9}$ M. De facto, desde cedo e graças à sua forte actividade biológica, sempre pudemos seguir facilmente a presença deste factor no decurso das diferentes etapas de purificação. Por seu turno, a evidência física da molécula (banda em electroforese, pico em perfil de DO, etc.) não foi nunca possível. A completa purificação e a caracterização da molécula (MALDI-TOF e impressão digital peptídica) só pôde ser realizada porque, a cada etapa de purificação, efectuámos sempre uma forte concentração das fracções positivas. Partimos de um volume de sobrenadante de cultura de seis litros e, no final, obtivemos 2 mL de uma solução pura na qual a toxina podia ser identificada por um pico obtido na DO com o comprimento de onda de 214 nm. Mostrámos, assim, que a alfa-Xenorhabdolisina, sensível ao calor (60° C) e à tripsina, é uma pequena

proteína de 10 789 Da. De momento ainda não sabemos se ela é uma proteína simples ou se possui um agrupamento glucídico ou lipídico. Após digestão com a tripsina, o perfil peptídico obtido não corresponde a nenhuma proteína actualmente conhecida nos diferentes bancos consultados. Estamos quase certos de que esta molécula corresponde a uma toxina bacteriana inteiramente nova. Por conseguinte, ela apresenta um interesse que vai muito para além da sua função nas relações insecto-bactéria. Neste contexto, é primordial o conhecimento do modo de acção da  $\alpha$ -Xlis sobre as células alvo e de saber por intermédio de qual mecanismo é que ela perturba a fisiologia celular. A última parte deste trabalho de tese foi inteiramente consagrada a esta tarefa.

\* Foram utilizadas diferentes técnicas para caracterizar os efeitos da alfa-Xenorhabdolisina sobre os hemócitos.

Num primeiro tempo mostrou-se que as perturbações descritas em microscopia fotónica, com os sobrenadantes de cultura bacteriana, se reencontravam aquando das incubações com as fracções purificadas. Em particular observou-se uma importante vacuolização dos hemócitos que precedia a sua lise por necrose. Depois observa-se uma importante dilatação dos granulócitos e dos plasmatócitos, a qual pode ir até ao rebentamento destas células se forem utilizadas soluções muito concentradas da toxina. Um estudo fino das modificações citológicas induzidas por diferentes doses de toxina purificada foi efectuado em microscopia electrónica. O resultado mais original obtido aquando deste estudo foi o de mostrar que os vacúolos observados em microscopia fotónica eram, de facto, constituídos por vesículas dilatadas do retículo endoplásmico e da cisterna perinuclear. Um tal efeito tinha sido já descrito por Abrami *et al.*, (1998 a,b e 2000) que estudaram os efeitos de uma toxina produzida por *Aeromonas hydrophila* sobre células de mamíferos em cultura. O processo fisiológico que conduziu à fixação da toxina sobre a superfície externa da membrana celular, até à dilatação do retículo não é conhecido actualmente. A alfa-Xenorhabdolisina é a segunda toxina bacteriana purificada capaz de produzir este efeito. Esta molécula aparece, portanto, como uma molécula muito importante constituindo uma ferramenta que poderá ser

utilizada no estudo da fisiologia celular em geral. Além disto, a utilização de soluções com diferentes concentrações de toxina permitiram evidenciar outros fenómenos também muito importantes. As soluções muito diluídas de alfa-Xenorhabdolisina não induzem a necrose dos hemócitos, mesmo após incubações demoradas de várias horas. Contudo, nestas condições, observa-se uma percentagem muito importante de granulócitos corados com a reacção TUNEL característica da apoptose. Parece razoável concluir que, em função da concentração e da duração da incubação, a alfa-Xenorhabdolisina é capaz de induzir tanto a necrose como a apoptose nas células alvo nucleadas. Este fenómeno está profusamente documentado para variadas citotoxinas de origem bacteriana.

O seguimento do trabalho permitiu compreender as primeiras etapas da cadeia de reacções que terminam na vacuolização seguida da necrose dos granulócitos e dos plasmatócitos. Foi demonstrado, em particular, que a citotoxina uma vez fixada sobre a membrana celular não pode ser reciclada para ser ulteriormente reutilizada. Ficou demonstrado que não se trata de uma actividade enzimática. A partir deste resultado surgiu, naturalmente, a hipótese que a molécula podia agir como uma porina capaz de perturbar o equilíbrio iónico da membrana celular. Os resultados das experiências de protecção osmótica, realizadas com polietilenoglicol de diferentes dimensões moleculares, confortaram a hipótese avançada e permitiram mesmo a proposição de que a dimensão do diâmetro dos poros formados pela alfa-Xenorhabdolisina, na membrana celular dos granulócitos e das hemácias de carneiro, é de 4,6 à 5,8 nm. Esta perturbação do equilíbrio iónico foi confirmada pela evidência de uma entrada em massa do cálcio nos granulócitos momentos antes da lise celular. Enfim, a utilização de técnicas de patch-clamp permitiram evidenciar que a primeira actividade da alfa-Xenorhabdolisina era a de modificar a permeabilidade da membrana ao potássio. Esta perturbação da permeabilidade aos iões potássio é, de facto, a primeira etapa dos processos celulares activados pela alfa-Xenorhabdolisina e que conduzem à lise das células. O efeito dos inibidores específicos dos canais potássio (TEA, TBA) adicionados em diferentes

concentrações à solução de citotoxina, permitiram a protecção em parte ou na totalidade da vacuolização dos hemócitos seguida da sua lise por necrose. De momento desconhece-se se estes inibidores protegem igualmente os hemócitos da apoptose induzida por doses muito mais fracas da mesma citotoxina. A acção da alfa-Xenorhabdolisina sobre os hemócitos de insectos pode, finalmente, ser resumida do seguinte modo:

- fixação sobre a membrana celular
- formação ou activação de um canal potássio
- dilatação de retículo endoplasmico
- lise por necrose (uma fraca concentração pode induzir a apoptose).

# **Perspectivas**

Os resultados que obtivemos mostram perspectivas de investigação em diferentes domínios. Três desses domínios parecem-nos mais prometedores pela importância dos conhecimentos que eles permitirão adquirir.

\* Estudo dos hemócitos de insectos

Tratam-se principalmente de trabalhos sobre a caracterização dos hemócitos. Estas células são de momento definidas pelas classificações actuais que, no essencial, assentam em critérios puramente morfológicos e ultraestruturais. As tentativas efectuadas por diferentes equipas (grupo de N. Ratcliffe e T. Trenczek) no sentido de evidenciarem os marcadores da superfície celular, utilizando os anticorpos monoclonais, mostraram que tais utensílios eram demasiado precisos. Com efeito, os marcadores definidos eram válidos para a espécie a partir da qual os anticorpos eram produzidos, mas que não podiam ser utilizados para efectuar uma caracterização dos tipos celulares para além da espécie do insecto em estudo. No nosso trabalho mostrámos que os Granulócitos de *S. littoralis* e, também, *M. unipuncta* podiam ser marcados especificamente por uma lectina afim de certos galactósidos. Este trabalho poderá ser estendido a outras espécies para determinar se esta afinidade é particular a *Spodoptera* e a *Mythimna* ou se ela se é reencontrada em Gr de outras espécies de insectos. Este trabalho deverá ser acompanhado do desenvolvimento de técnicas permitindo obter populações puras de hemócitos a fim de testarem as complementaridades dos diferentes tipos celulares nas reacções de defesa.

\* Factores de virulência de *Xenorhabdus*

No nosso estudo foram evidenciados, no meio de cultura de *X. nematophila*, vários factores apresentando actividades biológicas que foram relacionados com a virulência (citotoxinas, proteases). Cada um destes factores merecia com certeza um estudo aprofundado. Pensamos que uma atenção particular deveria ser concedida a dois de entre eles que possuem por alvo as células imunocompetentes dos insectos.

- O factor de descolamento de hemócitos aparece como prioritário neste estudo. Mostrámos sem nenhuma dúvida que ele está ligado a uma actividade proteásica presente nos extractos estudados. A (ou as) proteáse(s) poderiam ser purificadas e caracterizadas. Disporíamos, assim, de moléculas puras, claramente identificadas com a muito provável função imunodepressora a qual poderia ser facilmente controlada. Outra vantagem seria a melhor compreensão do modo como *X. nematophila* se consegue instalar no hemocélio dos insectos, disporíamos assim de factores potencialmente utilizáveis na luta insecticida.

- Por seu turno, mostrámos que nas culturas *in vitro*, a bactéria *X. nematophila* podia produzir, pelo menos, duas hemolisinas diferentes cada qual possuindo uma actividade citolítica específica sobre os hemócitos. Uma destas citolisinas, a  $\alpha$ -Xlis, foi o objecto do presente trabalho. Um outro eixo de pesquisa poderá ser consagrado ao estudo da segunda citotoxina que aparece mais tardiamente nos meios de cultura, que resiste ao calor e cujos alvos celulares parecem ser diferentes. Com grande probabilidade, este tipo de estudo poderá conduzir à descoberta e caracterização de uma nova citotoxina bacteriana, activa contra células de insectos.

\* Prosseguimento dos estudos sobre a  $\alpha$ -Xenorhabdolisina

Dispomos agora de uma nova citotoxina, produzida por uma bactéria entomopatogénica e activa, entre outras, contra os imunócitos ou as células do epitélio digestivo dos insectos. O primeiro trabalho será o de clonar o gene codificante para esta molécula. Como dispomos de fracções purificadas, uma sequenciação parcial da proteína deverá fornecer elementos que permitam pesquisar os ARNm para produzir o ADNc. Os trabalhos focalizados sobre esta molécula podem desenvolver-se em duas direcções principais. O primeiro destes eixos de investigação diz respeito à actividade sobre o epitélio digestivo. Se esta actividade for reencontrada *in vivo*, esta proteína investe-se da primeira importância para ser utilizada como insecticida biológico. O segundo eixo de investigação respeita ao prosseguimento do nosso estudo sobre os efeitos da

$\alpha$ -Xlis sobre os macrófagos de insectos. Este é o eixo de investigação que pensamos privilegiar e que iremos detalhar.

Certos resultados indicam que a muito fraca concentração, esta citotoxina pode induzir *in vitro* a apoptose dos macrófagos de *S. littoralis*. Dispomos, por conseguinte, de uma ferramenta original para analisar esta reacção sobre um modelo invertebrado. O plano deste estudo poderá ser o seguinte:

**- Apoptose, oncose, paraptose ou necrose?**

Todas as nossas observações respeitantes à apoptose, foram efectuadas após marcação TUNEL das células. Apesar desta reacção ser particularmente bem demonstrativa da apoptose conhecem-se, contudo, excepções nas quais a morte por oncose (uma forma de necrose) é uma reacção dependente das caspases e origina uma reacção positiva ao TUNEL. De igual modo foi recentemente descrita uma reacção de morte celular programada, a paraptose, fazendo intervir uma caspase (caspase 9) mas diferente da apoptose. Finalmente, têm sido descritas reacções de apoptose que não fazem intervir as caspases.

O primeiro objectivo será, portanto, o definir se a morte provocada *in vitro* pela  $\alpha$ -Xlis se faz por apoptose ou necrose. Os resultados preliminares deixam supor que os dois coexistem. Para efectuar este estudo utilizaremos quatro tipos de técnicas para além da reacção TUNEL:

- marcação da inversão da fosfatidilserine pela Anexina V, em reacção acoplada ao iodeto de propí dio;
- estudo da ruptura do potencial de membrana das mitocondrias;
- estudo ultrastrutural permitindo reencontrar as diferentes morfologias nucleares, mitocondriais, citoplásmicas e do retí culo endoplásmico rugoso;
- evidenciação electroforética do padrão de fragmentação do ADN.

***- A indução da apoptose provocada.***

Este estudo basear-se-á principalmente na definição de qual a estrutura da membrana celular responsável pela fixação da citotoxina (receptor específico do tipo proteico ou lipídico da bicamada). Se se tratar de uma proteína é necessário tentar a sua purificação e caracterização (técnicas de bioquímica clássica e BiaCore).

Alguns outros factores conhecidos na indução da apoptose nos mamíferos ( $\alpha$ TNF e seu receptor, e os ligandos do tipo Fas/Fas ) serão igualmente pesquisados com a ajuda de anticorpos heterólogos.

***- Indução da apoptose provocada nos macrófagos de insectos .***

Com a ajuda de marcadores específicos e de inibidores utilizados nos vertebrados e nos invertebrados, tentar-se-á mostrar se as diferentes etapas actualmente conhecidas na apoptose, se reencontram nos macrófagos de insectos. Este trabalho incidirá essencialmente sobre as modificações do equilíbrio iónico (potássio e cálcio) como etapa precoce: análise qualitativa e quantitativa em microspectrometria. Intervenção de diferentes caspases e a sequência da sua activação serão igualmente analisadas.

***- Pesquisa da activação de genes específicos .***

A técnica dos bancos substractivos será utilizada para evidenciar os genes especificamente activados aquando do desenvolvimento da apoptose induzida pela  $\alpha$ -Xenorhabdolisina.