

Carlos Alberto Gomes Ribeiro



**Efeito sobre os hemócitos de insectos de um factor citotóxico  
produzido pela bactéria *Xenorhabdus nematophila*  
(Enterobacteriaceae)**

**Pesquisa de actividades citotóxicas  
Purificação e caracterização da citotoxina**



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

PONTA DELGADA

2002

**Carlos Alberto Gomes Ribeiro**

**Efeito sobre os hemócitos de insectos de um factor citotóxico  
produzido pela bactéria *Xenorhabdus nematophila***

**(Enterobacteriaceae)**

**Pesquisa de actividades citotóxicas**

**Purificação e caracterização da citotoxina**



**Universidade  
dos Açores**



**ITQB/Universidade  
Nova de Lisboa**



**Université  
Montpellier II**

Dissertação para a obtenção  
do grau de Doutor em Biologia,  
especialidade de Biologia Celular e Molecular,  
apresentada à Universidade dos Açores em  
28 de Outubro de 2002

**Orientador: Directeur de Recherches I do CNRS, Doutor Michel Brehélin**

**Co-orientador: Professor Auxiliar da FCL, Prof. Doutor Manuel Pedro Salema Fevereiro**

UNIVERSIDADE DOS AÇORES

PONTA DELGADA

2002

à Elvira

e à Marta

## ***Agradecimento Institucional***

O doutorando e bolsheiro agradece, com especial ênfase, o apoio financeiro decisivo e imprescindível que recebeu do Ministério para a Ciência e a Tecnologia, através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e do Fundo Social Europeu (FSE), no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio, na forma de uma **Bolsa de Doutoramento, PRAXIS XXI (BD/13935/97)**, sem a qual não lhe teria sido possível efectuar o trabalho que lhe permitiu apresentar a sua dissertação de doutoramento.

## **Declaração**

Na presente dissertação incluem-se resultados que foram alvo de publicação ou submetidos para publicação em colaboração com vários outros autores como estão abaixo discriminadas.

Para efeitos do disposto no nº 2 do Artigo 8º do Decreto-Lei 388/70, o autor da presente dissertação declara que interveio na concepção e execução do trabalho experimental, na interpretação dos resultados e na redacção dos manuscritos publicados e/ou enviados para publicação.

Junho de 2002

Carlos Alberto Gomes Ribeiro

### **Artigos Publicados em Revista**

1996 **Ribeiro, C., N. Simões & M. Brehélin.** Insect Immunity: The hemocytes of *Mythimna unipuncta*: (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defense reactions. *In vivo* and *In vitro* studies. ***Journal of Insect Physiology*, 42(9):815-822.** (Impact factor 1.9).

1999 **Ribeiro, C., B. Duvic, P. Oliveira, A. Givaudan, F. Palha, N. Simões & M. Brehélin.** Insect Immunity: Effects of cytotoxic factors produced by a nematobacterial complex on immunocompetent cells. ***Journal of Insect Physiology*, 45(7):677-685.** (Impact factor 1.8).

2000 **Brillard, J., C. Ribeiro, N. Boemare, M. Brehélin & A. Givaudan.** Two Distinct Hemolytic activities in *Xenorhabdus nematophila* are Active on Insect Immunocompetent Cells. ***Applied and Environmental Microbiology*, 67(6):2515-2525.** (Impact factor 3.7).

2003 **Ribeiro, C., M. Vignes e M. Brehélin.** *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) Secretes a Cation-selective Calcium-independent Porin Which Causes Vacuolation of the Rough Endoplasmic Reticulum and Cell Lysis. ***The Journal of Biological Chemistry*, 278(5):3030-3039**

### **Comunicações em Congresso**

2000 **Brillard, J., C. Ribeiro, N. Boemare, M. Brehélin & A. Givaudan.** Gene regulation and expression of hemolytic/cytolytic activity from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. "33rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology" and "Vth International Conference on *Bacillus thuringiensis*", Guanajuato, México, 13-18 August, 2000.

2001 **Brillard, J., C. Ribeiro, N. Boemare, M. Brehélin & A. Givaudan.** *Xenorhabdus nematophila* produces two distinct cytolytic activities against insect hemocytes. "34th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology" and "VIth International Conference on *Bacillus thuringiensis*", "34th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology" and "VIth International Conference on *Bacillus thuringiensis*", 25-30 August, 2001, Noordwijkerhout, The Netherlands, p:29.

2001 **Brillard, J., C. Ribeiro, N. Boemare, M. Brehélin & A. Givaudan.** Cytolytic activities from *Xenorhabdus nematophila* are active on immunocompetent insect cells. COST 850, Meet.WG2 "Bioreactive Molecules", 31th August, Wageningen, The Netherlands, p:13

### **Submetidos:**

**Ribeiro, C., M. Vignes, P.A. Girard, S. Baghdiguan e M. Brehélin.** The *flhD* dependent cytotoxin of *Xenorhabdus nematophila* induces both necrosis and apoptosis in insect immunocompetent cells

# Índice

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
<b>1ª PARTE - ESTUDO BIBLIOGRÁFICO</b>	6
1. O Complexo nematobacteriano	7
2. Ciclo de Vida	10
3. As toxinas de origem bacteriana	16
3.1. Citolisinas: Toxinas bacterianas com acção sobre a membrana celular	17
3.1.1. Toxinas formadoras de poros	17
3.1.2. Toxinas com acção detergente	18
3.1.3. Toxinas com acção enzimática	18
3.2. Toxinas bacterianas com acção sobre alvos intracelulares	18
4. Dados sobre o Sistema Imunitário dos Insectos	19
4.1. As Reacções de Defesa Celular	22
4.1.1. Fagocitose	22
4.1.2. Nodulação e Encapsulamento	27
4.2. As Reacções de Defesa Humoral	29
4.2.1. Melanização	29
4.2.2. Coagulação	31
4.2.3. Lectinas	33
4.2.4. Hemolina	34
4.2.5. Péptidos antimicrobianos	35
<b>2ª PARTE - MATERIAL E MÉTODOS</b>	37
1. Material Biológico	38
1.1. Insectos	38
1.1.1. <i>Galleria mellonella</i> (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae)	38
1.1.2. <i>Mythimna unipuncta</i> e <i>Spodoptera littoralis</i> (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)	39
1.2. Complexo simbiote nematobacteriano	39
1.2.1. Multiplicação de <i>S. carpocapsae</i>	40
1.2.2. Desinfecção em superfície da cutícula de <i>S. carpocapsae</i>	40
1.2.3. Isolamento e caracterização de <i>X. nematophila</i>	41
1.2.4. Multiplicação e armazenamento de <i>X. nematophila</i>	41
1.3. <i>S. carpocapsae</i> axénico	42
1.4. Complexo simbiote monoxénico	43
1.5. <i>X. nematophila</i> – estirpe F1/1	43
1.5.1. Extracção e doseamento de LPS de <i>X. nematophila</i>	44

1.5.2.	Determinação da curva de crescimento populacional de <i>X. nematophila</i>	44
1.6.	Bioensaios	45
1.6.1.	Injecção de <i>X. nematophila</i> . Estudo da cinética de produção de factores citotóxicos <i>in vivo</i>	45
1.6.2.	Avaliação e quantificação da mortalidade larvar	46
1.6.3.	Manipulação das lagartas e recolha da hemolinfa	47
2.	Técnicas de Citologia	48
2.1.	Microscopia Óptica	48
2.1.1.	Caracterização das populações hemocitárias em microscopia óptica. Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH)	48
2.1.2.	Contagem Total de Hemócitos (CTH)	48
2.1.3.	Variação do volume de hemolinfa	49
2.1.4.	Variação da imagem sanguínea	49
2.1.5.	Obtenção de hemócitos em monocamadas	50
2.1.6.	Preparação de culturas primárias de hemócitos	51
2.1.7.	Linhagem celular <i>SI2b</i>	51
2.1.8.	Detecção da necrose celular. Avaliação da viabilidade e/ou mortalidade celular	52
2.1.9.	Avaliação da aderência e/ou desaderência celular	52
2.1.10.	Detecção de receptores membranares Lectina ou LPS sobre hemócitos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	53
2.1.11.	Observação de vacúolos celulares e quantificação do grau de vacuolização	54
2.1.12.	Análise Estatística	55
2.2.	Microscopia Electrónica	55
2.2.1.	Caracterização ultraestrutural de hemócitos em microscopia electrónica de transmissão	55
2.2.2.	Preparação do material biológico para observação em microscopia electrónica de varrimento (MEV)	56
2.3	Detecção da Apoptose Celular	57
2.3.1.	Apoptose em culturas primárias de hemócitos	57
2.3.2.	Padrão de fragmentação do DNA genómico	58
2.3.2.1.	Extracção do DNA genómico dos hemócitos	58
2.3.2.2.	Electroforese em gel de agarose do DNA genómico	59
2.4.	Caracterização electrofisiológica de hemócitos	59
2.5.	Medição da concentração do cálcio citossólico livre. Cálcio total na população de hemócitos e em células individuais	61
2.6.	Medição da concentração de potássio intracelular livre. Potássio total na população de hemócitos e em células individuais	62
3.	Técnicas de Purificação de Proteínas	62
3.1.	Meios de cultura e condições de incubação	62
3.1.1.	Meios de cultura e condições de incubação do complexo simbiote, do nemátodo axénico e da bactéria	63
3.2.	Tratamento de extractos brutos e obtenção dos sobrenadantes de cultura	64

3.3.	Preparação dos sobrenadantes dos meios de cultura para a cromatografia	64
3.3.1.	Diafiltração	64
3.3.2.	Precipitação do Sulfato de Amónio	65
3.4.	Cromatografia líquida (FPLC e HPLC)	66
3.4.1.	Cromatografias de troca aniónica em sistema FPLC Pharmacia	66
3.4.2.	Cromatografia de filtração em gel no sistema FPLC Pharmacia	67
3.4.3.	Cromatografia de filtração em gel no sistema HPLC Waters 990	67
3.4.4.	Cromatografia de fase reversa (C18) em sistema HPLC Waters 990	68
3.5.5.	Análise em MALDI-TOF e Interrogação de Bancos Proteicos	68
4.	Análise e quantificação de proteínas	70
4.1.	Doseamento de proteínas	70
4.2.	Detecção e doseamento de actividade enzimáticas	70
4.2.1.	Detecção da actividade proteásica	70
4.2.2.	Detecção da actividade lipásica	72
4.2.3.	Detecção da actividade lecitínica (fosfolipásica)	72
4.3.	Electroforese em gel de sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE)	72
5.	Bioensaios para a detecção e quantificação das actividades citotóxica e hemolítica	73
5.1.	Ensaio de necrose celular sobre cultura de células da linhagem SL2b	73
5.2.	Ensaio sobre monocamadas de hemócitos	74
5.2.1.	Necrose celular	74
5.2.2.	Vacuolização celular	74
5.2.3.	Deslocamento celular	75
5.3.	Ensaio sobre hemácias	75
5.3.1.	Hemólise em meio líquido	75
5.3.2.	Efeito do aumento da concentração das hemácias sobre a actividade hemolítica	77
5.3.3.	Efeito do tempo de incubação sobre a actividade hemolítica	77
5.3.4.	Protecção osmótica das hemácias contra a hemólise em meio líquido	78
5.4.	Efeito das membranas das hemácias sobre as actividades citotóxica e hemolítica	79
5.4.1.	Obtenção da fracção membrana das hemácias de carneiro e coelho	79
5.4.2.	Efeito da fracção membrana das hemácias de carneiro e coelho sobre as actividades citotóxica e hemolítica	79
5.5.	Ensaio <i>in vivo</i> para produção, detecção e quantificação da actividade citotóxica e/ou hemolítica	80
5.6.	Ensaio para detecção de LPS (endotoxinas)	80
5.7.	Ensaio <i>in vitro</i> para a detecção e quantificação da actividade citotóxica dos LPS sobre monocamadas de hemócitos	81

5.8.	Intestino médio	81
5.9.	Protecção osmótica de hemócitos durante a incubação com amostras citotóxicas	82
5.10.	Caracterização ultraestrutural de hemócitos após incubação com amostras citotóxicas	82
5.11.	Resistência dos factores citotóxicos e/ou hemolíticos e desaderência de hemócitos a factores físicos e químicos	83
5.12.	Estudo da cinética da actividade hemolítica e/ou citotóxica mediante a temperatura de incubação	85
<b>3ªPARTE - RESULTADOS</b>		<b>87</b>
<b>CAPÍTULO 1 - Caracterização citomorfológica e funcional dos hemócitos</b>		<b>88</b>
1.1.	Tipos de hemócitos e funções	88
1.1.1.	Plasmatócitos (PI)	89
1.1.2.	Hemócitos granulares ou granulócitos (HGI)	92
1.1.3.	Células esféricas (Cesf)	95
1.1.4.	Oenócitos (Oe)	96
1.1.5.	Prohemócitos (PrH)	98
1.1.6.	Células vermiformes (Cvm)	98
1.1.7.	Células de grânulos/inclusões densas (Cgd)	99
1.2.	Viabilidade dos hemócitos em monocamadas	101
1.3.	Evolução da imagem sanguínea	102
1.4.	Detecção de receptores Lectina e LPS no plasmalema dos hemócitos	106
1.5.	Caracterização e viabilidade das células da linhagem <i>S/b2</i>	109
1.6.	Conclusão	111
<b>CAPÍTULO 2 - Detecção das Actividades Citolíticas / Citotóxicas</b>		<b>113</b>
2.1.	Complexo simbiote holoxénico e monoxénico	113
2.1.1.	Detecção da actividade citolítica/citotóxica sobre hemócitos	114
2.1.2.	Cinética de produção dos factores com actividades citotóxica e enzimática nos filtrados dos sobrenadantes dos meios de cultura do complexo simbiote	115
2.1.3.	Análise cromatográfica dos sobrenadantes dos meios de cultura do complexo simbiote	120
2.1.3.1.	Actividade Citolítica/Citotóxica	121
2.1.3.2.	Actividade Proteásica ou de Descolamento de Hemócitos	124
2.1.3.3.	Actividade Lipásica e Fosfolipásica/Lecitinásica	129
2.1.3.4.	Detecção de endotoxinas/LPS	129
2.1.4.	Perda das actividades com o tempo de conservação dos nemátodos holoxénicos e monoxénicos	130
2.1.5.	Conclusão	131

2.2.	Factores produzidos por <i>S. carpocapsae</i> axénico	131
2.2.1.	Detecção da actividade citolítica/citotóxica sobre hemócitos	132
2.3.	Factores produzidos por <i>X. nematophila</i>	132
2.3.1.	Obtenção e optimização de um teste para a detecção rápida das actividades citolítica e citotóxica: Hemólise em meio líquido	133
2.3.2.	Detecção de actividades citolíticas, citotóxicas, hemolíticas e enzimáticas nos filtrados dos sobrenadantes dos meios de cultura de <i>X. nematophila</i>	136
2.3.3.	Extracção e doseamento de LPS de <i>X. nematophila</i> . Detecção da actividade citolítica/citotóxica sobre hemócitos e hemolítica sobre hemácias de carneiro	141
2.3.4.	Caracterização dos factores citolíticos e citotóxicos	142
2.3.4.1.	Especificidade Celular	142
2.3.4.2.	Resistência aos factores físicos e químicos	146
2.4.	Conclusão	149
<b>CAPÍTULO 3 – Purificação e caracterização de um factor de citotoxicidade</b>		150
3.1.	Análise cromatográfica dos filtrados dos sobrenadantes dos meios de cultura de <i>X. nematophila</i>	152
3.2.	Purificação do factor responsável pela actividade do tipo C1	158
3.3.	Características bioquímicas e fisiológicas da $\alpha$ -Xenorhabdolisina	165
3.4.	Conclusão	169
<b>CAPÍTULO 4 – Estudo da actividade <math>\alpha</math>-Xlis sobre os hemócitos de insectos e as hemácias de carneiro</b>		171
4.1.	Natureza dos vacúolos formados pela $\alpha$ -Xlis	171
4.1.1.	Coloração pelo vermelho neutro	172
4.1.2.	Estudo em microscopia electrónica	172
4.1.3.	Conclusão	178
4.2.	A $\alpha$ -Xlis actua sobre a membrana celular e não é reciclada	178
4.2.1.	A $\alpha$ -Xlis actua sobre a membranas das células	179
4.2.2.	A actividade hemolítica não é proporcional à duração da incubação	182
4.2.3.	A percentagem de lise diminui com o aumento da concentração de hemácias	183
4.2.4.	Importância da temperatura na fixação da $\alpha$ -Xlis sobre a membrana	184
4.3.	Modificações induzidas da permeabilidade iónica	186
4.3.1.	Movimentos dos iões cálcio	186
4.3.1.1.	Medida sobre uma população de hemócitos	186
4.3.1.2.	Medida sobre células isoladas	188
4.3.1.3.	Conclusão	189

---

4.3.2. Movimentos dos iões potássio	190
4.3.2.1. Resultado do movimento dos iões potássio em registos sobre uma população de hemócitos	190
4.3.2.2. Conclusão	191
4.4. Estudo electrofisiológico e modificações da permeabilidade celular aos iões potássio em células individuais	191
4.4.1. Configuração sobre a membrana da célula aderente “on cell”	191
4.4.2. Efeitos dos inibidores dos canais potássio (TEA, TBA)	195
4.4.3. Configuração “inside-out”	196
4.4. Conclusão	197
4.5. Experiências de protecção osmótica	198
4.5.1. Protecção osmótica da hemólise das hemácias de carneiro	199
4.5.2. Protecção osmótica da lise de hemócitos	200
4.5.3. Restituição da lise celular após protecção osmótica	202
4.5.3.1. Caso da citólise de hemócitos	202
4.5.3.2. Caso da hemólise das hemácias de carneiro	203
4.5.4. Conclusão	204
4.6. Apoptose e Necrose	204
4.7. Outros tecidos alvo	207
4.8. Estudo da cinética de produção de $\alpha$ -Xlis <i>in vivo</i>	208
4.9. Estudo das alterações do hemograma de <i>S. littoralis</i> após injeção de <i>X. nematophila</i>	209
<b>4ªPARTE - DISCUSSÃO</b>	212
<b>DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO</b>	236
<b>PERSPECTIVAS</b>	245
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	250

## ***Agradecimentos***

Sem dúvida que a presente dissertação não teria sido realidade sem a confiança e apoio que o **Doutor Michel Brehélin** em mim sempre depositou. A nossa estreita colaboração dura desde 1992 e os resultados têm sido bastante profícuos. O culminar desta colaboração está consubstanciado na superior orientação que efectuou a este meu trabalho. Agradeço o entusiasmo e a entrega com que sempre contei, a alegria partilhada nos momentos de sucesso, o apoio nos de desânimo e as sempre úteis e prolongadas discussões com as quais muito aprendi. Deixo aqui o meu profundo e caloroso agradecimento, não podendo deixar de dizer que as palavras são insuficientes para expressar o meu obrigado.

A maior parte do trabalho foi efectuado no então denominado Laboratoire de Pathologie Comparée na Université de Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, (UMII-INRA-CNRS), dirigido pelo **Doutor Noel Boemare**, (actualmente denominado INRA-UMII 1133, Laboratoire d'Ecologie Microbienne des Insects et Interactions Hôte-Pathogène-EMIP) o qual estava organicamente integrado na Station INRA de St. Christol les Alès dirigida pelo Doutor Gerard Devauchelle. A ambos agradeço todas as facilidades laboratoriais e financeiras colocadas à minha disposição para que pudesse ter desenvolvido o meu trabalho nas melhores condições. Aproveito para estender o meu agradecimento a toda a equipa destes laboratórios ao apoio técnico recebido de Jean Luciani e Mark Ravalec e, permito-me destacar em especial, o Dr. Bernard Duvic e o Dr. Alain Givaudan aos quais agradeço a colaboração científica e as vantajosas discussões científicas que com eles mantive.

Ao **Prof. Doutor Pedro Fevereiro** agradeço a disponibilidade com que sempre me recebeu no seu laboratório e às facilidades técnicas e financeiras que também colocou à minha disposição. A aventura desta dissertação com ele começou quando acreditou que era possível purificar a citotoxina bacteriana. Logo nos primeiros instantes se entusiasmou e delineou a metodologia que viria a consagrar-se como ajustada para os nossos objectivos. Sempre lhe ouvi os melhores conselhos científicos e técnicos, sempre contei com a sua entrega e apoio

ao trabalho, à discussão dos resultados, ao incentivo incansável com que se afadigou a apoiar-me. Também, neste caso, as palavras são insuficientes para expressar o meu profundo e caloroso agradecimento ao modo como co-orientou o meu trabalho e ao muito que me ensinou. Aproveito para agradecer a colaboração e apoio de todos quantos trabalham no laboratório que dirige no ITQB/Oeiras onde permaneci alguns meses em estágio.

Foram muitos os apoios financeiros que recebi para efectuar os meus estágios de trabalho em Oeiras e em Montpellier. Neste contexto, quero expressar o meu agradecimento às entidades nacionais e internacionais que o fizeram, ou seja, JNICT/CNRS; ICCTI/CNRS; ICCTI/Embaixada de França em Lisboa; Acção COST 819 e, finalmente, ao decisivo e imprescindível apoio da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, (FCT) e Fundo Social Europeu (FSE), Programa PRAXIS XXI, na forma de Bolsa de Doutoramento (BD/13935/97). Sem estes apoios o trabalho não teria sido realizado.

Ao Dr. Stephen Baghdiguan agradeço, muito particularmente, por me ter iniciado nos segredos da manipulação da microscopia confocal e por ter passado algumas horas a ajudar-me a observar o material biológico. Estendo os meus sinceros agradecimentos aos Dr. Alain Bienvenue e Dr. Paul Mangeat, que dirigem o Lab. de Dynamique Moléculaire des Interactions Membranaires da Univ. de Montpellier II, onde se encontra o equipamento utilizado.

Ao Dr. Michel Vignes o meu agradecimento é enorme. Passámos longos dias a observar e registar o comportamento dos hemócitos com recurso às técnicas de electrofisiologia que ele tão bem domina. O seu apoio foi imprescindível para que tivéssemos obtido os resultados que constam desta dissertação e que serão publicados em breve. O meu agradecimento é extensível ao Dr. Max Recasens que dirige o Lab. Plasticité Cerebrale da Univ. de Montpellier II, onde se encontram os equipamentos utilizados.

Agradeço às sucessivas Direcções do Departamento de Biologia a cargo, respectivamente, do Dr. João Tavares e do Prof. Dr. António Martins, todo o apoio que sempre me deram em alturas decisivas. Com efeito, sem o apoio financeiro e institucional eu não poderia ter feito o trabalho com tanta facilidade.

Agradeço o apoio institucional que sempre recebi da reitoria na pessoa dos seus Magníficos reitores e, particularmente, ao Professor Doutor Vasco Garcia pela sua acção em momentos decisivos da minha vida académica.

Aos meus queridos amigos e colegas Filipa Palha e Paulo Oliveira agradeço a amizade e a colaboração nos trabalhos que efectuámos nos primórdios da nossa caminhada académica conjunta. Recordo com saudade o tempo que passámos a trabalhar e a discutir metodologias e resultados. O meu muito obrigado caloroso e amigo.

Ao meu querido amigo e colega Jorge Medeiros, agradeço o empenho com que efectuou as observações, registo fotográfico e obtenção das fotografias do material biológico submetido à observação em microscopia electrónica de varrimento e que constam desta tese.

Agradeço a todos quantos me apoiaram nas mais diversas situações. Por vezes uma palavra de incentivo e apoio contam muito. A amizade e a consideração com que todos me têm rodeado deram-me o ambiente e confiança necessários para concluir com êxito a minha dissertação. Não posso inumerar ninguém porque são muitos. Ao lerem estas linhas cada um deles saberá a quem me endereço deste modo amigo e fraternal. A todos sem excepção o meu agradecimento.

À Elvira, minha companheira de 25 anos a quem, em conjunto com a nossa filha Marta, dedico o trabalho, agradeço todo o apoio que recebi, principalmente, devido às minhas prolongadíssimas ausências em Oeiras e Montpellier. Não é possível descrever todo o apoio de ordem familiar e pessoal que me prestou. O pouco que posso dizer é que lhe estou agradecido para sempre.

## ***Abreviaturas***

°C	grau centígrado
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrómetro
FITC	fluoresceína isotiocianato
L	Litro
LB	meio Luria-Bertani
LPS	lipopolissacáridos
M	molar
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mOsmol	miliosmoles
MTH	meio tyrode hemolinfa
nm	nanómetro
NMTH	meio tyrode hemolinfa de incubação do complexo simbiote
NTSB	caldo de digerido tripsínico de soja de incubação do complexo simbiote
PBS	tampão fosfato salino
rpm	rotações por minuto
s	segundo
TBS	tampão tris-salino
TSB	caldo de digerido tripsínico de soja
xg	vezes a gravidade
XnLB	meio Luria-Bertani de incubação da bactéria simbiote
XnMTH	meio tyrode hemolinfa de incubação da bactéria simbiote
XnTSB	caldo de digerido tripsínico de soja de incubação da bactéria simbiote