



Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
Departamento de Saúde Coletiva



Mestrado em Saúde Pública

---

**Estudo ultraestrutural da resposta imune  
celular em *Rhodnius prolixus*  
(HEMIPTERA; REDUVIIDAE;  
TRIATOMINAE).**

---

**ANDREZZA RAPOSO BORGES**

---

Recife, 2006

**Andrezza Raposo Borges**

**Estudo ultraestrutural da resposta imune celular em  
*Rhodnius prolixus* (HEMIPTERA; REDUVIIDAE;  
TRIATOMINAE)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de mestre em saúde pública Departamento do departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

**Orientadora:**

**REGINA CÉLIA BRESSAN QUEIROZ DE FIGUEIREDO**

**Recife, 2006**

## Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

B732e

Estudo ultraestrutural da resposta imune celular em *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae; Triatominae). / Andreza Raposo Borges. — Recife: F. M. G. C. Bandeira, 2006.

77 f.: il., tab., graf., figs.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

Orientadora: Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo.

1. *Rhodnius*. 2. Insetos – ultraestrutura. 3. Fagocitose. I. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz de. II. Título.

CDU 595.7

---

**Andrezza Raposo Borges**

**Estudo ultraestrutural da resposta imune celular em  
*Rhodnius prolixus* (HEMIPTERA; REDUVIIDAE;  
TRIATOMINAE)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de mestre em saúde pública Departamento do departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Dissertação apresentada no dia 06 de março de 2006, e avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

---

Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque – UFPE

---

Dr. Fábio André Brayner dos Santos – CpqAM/FIOCRUZ (Revisor)

---

Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior – UFRPE (Suplente)

---

Dr. Luiz Carlos Alves – CpqAM/FIOCRUZ (Suplente)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e ao meu Senhor do Bonfim que me guiaram para realização deste trabalho, proporcionando-me vida, saúde, força e inteligência;

À minha orientadora e amiga Dra. Regina Figueiredo pela sua valiosa orientação, confiança, amizade e acima de tudo, pelos ensinamentos que ao longo de todos estes anos proporcionaram o meu desenvolvimento científico, sabendo com muito respeito conduzir a orientação deste trabalho;

Ao Dr. André Furtado pela valiosa ajuda e apoio científico dado durante o desenvolvimento desta tese;

Aos meus pais Vera Borges e Adelson Silva pelo amor, dedicação dispensados na construção de meus objetivos e ideais;

Ao meu irmão Anderson Borges, minha cunhada Érika Borges pela força e ao meu sobrinho Henrique Borges pela felicidade, que me proporciona com o seu sorriso;

Ao meu marido Roberto Melo pela sua companhia, paciência e carinho cada dia mais presente;

Ao Dr. Rômulo Maciel Filho, diretor do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM, por ter permitido a realização deste trabalho;

Ao Dr. Eduardo Freese e à Dra. Yara Gomes, coordenador da pós-graduação e coordenadora do mestrado do CPqAM, respectivamente, pela dedicação e prestatividade no decorrer deste curso;

Aos Drs. Luiz Alves e Fábio Brayner pelas sugestões, incentivos e acima de tudo companheirismo e amizade;

Às Dras. Christina Peixoto e Janaína Miranda pelo apoio e convivência.

À Dra. Nilma Cintra Leal, do departamento de microbiologia, pelas valiosas colônias de *Staphylococcus aureus*, utilizados neste trabalho;

À Priscila Santos, minha primeira co-estagiária de iniciação científica, pela contribuição no desenvolvimento dos experimentos, bem como pela sua amizade;

À Elisângela Dias, Fábiana Cristiane, Karina Saraiva, Karla Patrícia, e Cecília Ferreira, pelos momentos de descontração e amizade nos momentos mais difíceis;

A Raimundo Nazareno e Rodrigo Martins pela revelação das fotos e Sergio Santos pela contrastação das amostras, em microscopia eletrônica de transmissão.

Aos meus estagiários de vocação científica, Alice Rodrigues e Kleber dos Santos, pela singela ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho;

A todos os colegas do laboratório Biologia Celular e ultraestrutura pela força e convívio;

À Nalva Menezes e Nilda Lima, da secretaria acadêmica do NESC/CPqAM, pelo apoio e ajuda prestada durante estes anos;

À equipe da informática, em especial a Pedro Neto, pelo suporte técnico indispensável durante a digitação desta dissertação;

Aos colegas de Mestrado, pela convivência e amizade durante estes dois anos;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pelo apoio financeiro;

E finalmente, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o andamento e conclusão desta dissertação.

## RESUMO

No presente estudo nós usamos microscopia eletrônica e confocal a laser para caracterizar morfológicamente os hemócitos de ninfas de quinto estágio em *Rhodnius prolixus*, bem como a resposta imune celular deste inseto contra partículas bióticas e abióticas. Seis tipos de hemócitos foram encontrados: prohemócitos, plasmatócitos, oenocitóides, granulócitos tipo I e tipo II e adipohemócitos. Plasmatócitos e prohemócitos foram os tipos celulares mais abundantes nestes insetos. Através do uso da marcação com laranja de acridina e microscopia confocal a laser os prohemócitos foram facilmente distinguidos das demais células por apresentarem fluorescência homogênea e ausência de compartimentos ácidos. Os plasmatócitos, granulócitos tipo I e II e os oenocitóides apresentaram compartimentos acídicos que variaram em tamanho, distribuição e intensidade de fluorescência. Oenocitóides apresentaram uma forte fluorescência no citoplasma e uma marcação característica no núcleo. Uma fraca marcação foi observada nos adipohemócitos e as inclusões lipídicas presentes no citoplasma destas células não puderam ser visualizadas através da microscopia confocal. A porcentagem relativa de plasmatócitos e prohemócitos variou consideravelmente após a inoculação de bactérias e partículas de látex. Nossos dados demonstraram que os plasmatócitos são os únicos tipos celulares envolvidos na fagocitose. Como em células de mamíferos, dois modos distintos de fagocitose puderam ser observados: fagocitose tipo “trigger” e “zipper”. Processos de melanização e microagregação não foram observados contra partículas de látex e *Escherichia coli*. Por outro lado, *R. prolixus* produziu uma forte reação de melanização contra *Staphylococcus aureus*. As alterações ultraestruturais observadas em plasmatócitos,

adipohemócitos e oenocitóides sugerem que estes hemócitos estão diretamente envolvidos na defesa imune de *R. prolixus* contra partículas estranhas.

## ABSTRACT

In the present study we used the combination of confocal and electron microscopy to best characterize the hemocytes 5<sup>th</sup> –instar nymphs of the triatomine bug *Rhodnius prolixus*, as well as the immune cellular response elicited by this insect to biotic and abiotic targets. Six hemocytes types were found in the hemolymph of *R. prolixus*: prohemocytes, plasmatocytes, oenocytoids, adipocytes and granulocytes type I and II. Plasmatocytes and prohemocytes were the most abundant cells found in these insects. By using both acridine orange staining and confocal laser microscopy, prohemocytes can be easily distinguished from the other types due to their homogeneous fluorescence and the absence of acid compartments. Plasmatocytes, granulocytes type I and II and oenocytoids presented intracellular acidic compartments which varies in size, distribution and fluorescence intensity. Oenocytoids presented a bright green fluorescence in the cytoplasm and characteristic nucleus staining. A weak staining was observed in adipohemocytes and the lipid inclusions present in the cytoplasm were not visualized under confocal microscopy. The relative percentage of plasmatocytes and prohemocytes changed considerably after immune challenge with both latex beads and bacteria. Our data demonstrated that plasmatocytes were the only cell type involved in the phagocytosis. As in mammal cells, the trigger and zipper modes of phagocytosis were observed. Neither melanization nor micro-aggregation were observed towards latex particles or *Escherichia coli*. On the other hand, *R. prolixus* produced a strong melanization reaction against *Staphylococcus aureus*. The ultrastructural changes observed in plasmatocytes, adipohemocytes and oenocytoids suggest that these

hemocytes types are directly involved in the immune defense of *R. prolixus* against foreign particles.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Lista de figuras

	Págs.
Figura 1 - Ciclo de vida dos triatomíneos.....	11
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro invertebrado.....	12
Figura 3 - Adulto de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	13
Figura 4 - Distribuição geográfica de <i>Rhodnius prolixus</i> nas Américas.....	14
Figura 5- Microscopia óptica de campo claro de hemócitos não desafiados de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	33
Figura 6- Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de <i>R. prolixus</i> .....	34
Figura 7- Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de <i>R. prolixus</i> .....	35
Figura 8- Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de <i>R. prolixus</i> .....	36
Figura 9- Morfologia dos hemócitos através do contraste diferencial e confocal a laser.....	39
Figura 10- Microscopia confocal a laser de um plasmatócito de <i>Rhodnius prolixus</i> não desafiado.....	40
Figura 11- Microscopia óptica de fluorescência e de contraste interferencial de hemócitos de <i>R. prolixus</i> inoculados com partículas de látex acopladas a FITC.....	40
Figura 12- Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de <i>R. prolixus</i> desafiados com partículas de látex.....	46
Figura 13- Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de <i>R. prolixus</i> desafiados com partículas de látex.....	47
Figura 14- Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de <i>R. prolixus</i> desafiados com <i>E. coli</i> .....	49
Figura 15- Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de <i>R. prolixus</i> desafiados com <i>E. coli</i> .....	50

Figura 16- Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de <i>R. prolixus</i> desafiados com <i>E. coli</i> .....	51
Figura 17- Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de <i>R. prolixus</i> desafiados com <i>S. aureus</i> , após 30 minutos da inoculação.....	54
Figura 18- Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de <i>R. prolixus</i> desafiados com <i>S. aureus</i> .....	55
Figura 19- Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de <i>R. prolixus</i> desafiados com <i>S. aureus</i> .....	56

### **Lista de gráficos**

	<b>Págs.</b>
Gráfico 1 – Porcentagem relativa dos tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa de <i>R. prolixus</i> não desafiados.....	32
Gráficos 2 - Porcentagem relativa dos tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa de <i>R. prolixus</i> , após inoculação de <i>E. coli</i> / <i>S. aureus</i> / P. látex, A) 30 minutos após inoculação; B) 60 minutos após inoculação; C) 120 minutos após inoculação .....	43

### **Lista de tabela**

	<b>Págs.</b>
Tabela 1- Resumo dos trabalhos relativos a classificação dos tipos de hemócitos encontrados em diferentes espécies de triatomíneos.....	57

## SUMÁRIO

	Págs.
<b>DEDICATÓRIA</b>	
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>7</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>7</b>
<b>Lista de gráficos.....</b>	<b>8</b>
<b>Lista de tabela.....</b>	<b>8</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1 Os triatomíneos .....	11
1.1.1. <i>Rhodnius prolixus</i> .....	13
1.2 Sistema imune dos insetos.....	15
1. 2. 1 Hemolinfa.....	16
1. 2. 2 Hemócitos.....	16
1. 2. 3. mecanismos de defesa dos insetos.....	18
1. 2. 3. 1 Resposta imune humoral.....	19
1. 2. 3. 2 Resposta imune celular.....	21
1. 2. 3. 2. 1 Fagocitose.....	21
1. 2. 3. 2. 2 Encapsulamento.....	23
1. 2. 3. 2. 3 Nodulação.....	24
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2. 1 Objetivo geral.....	26
2. 2 Objetivos específicos.....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3. 1 Colônia de triatomíneos.....	27

3. 2 Coleta da hemolinfa.....	27
3. 3 Fagocitose de partículas abióticas.....	27
3. 4 Fagocitose de partículas bióticas.....	28
3. 5 Porcentagem relativa dos tipos de hemócitos de <i>Rhodnius prolixus</i> após inoculação de partículas abióticas e bióticas.....	28
3. 6 Microscopia eletrônica de transmissão.....	28
3. 7 Laranja de acridina.....	29
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4. 1 Caracterização morfológica dos hemócitos de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	30
4. 2 Caracterização morfológica dos hemócitos de <i>R. prolixus</i> através da laranja de acridina.....	37
4. 3 Proporção relativa dos diferentes tipos de hemócitos de <i>R. prolixus</i> , após inoculação de partículas bióticas ou abióticas.....	41
4. 4 Fagocitose de partículas bióticas e abióticas por hemócitos de <i>R. prolixus</i> .....	44
4. 4. 1 Fagocitose de partículas de látex.....	44
4. 4. 2 Fagocitose de <i>Escherichia coli</i> (Gram <sup>-</sup> ).....	48
4. 4. 3 Fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram <sup>+</sup> ).....	52
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO 1- Parecer da Comissão de Ética em pesquisa do CpqAM.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO 2- Artigo.....</b>	<b>79</b>

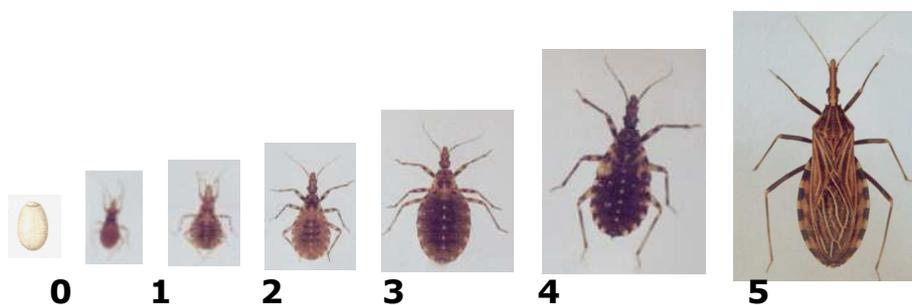
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Os triatomíneos

Os triatomíneos são insetos hematófagos obrigatórios, de hábitos noturnos, popularmente conhecidos como “Chupão”, “Barbeiro”, entre outras denominações. São de considerável importância em saúde pública, pelo fato de serem vetores potenciais do *Trypanosoma cruzi*, (CHAGAS, 1909), agente etiológico da doença de Chagas. Esta doença apresenta um grande impacto para saúde pública em toda América Latina. No Brasil particularmente, estima-se que mais de cinco milhões de pessoas sejam portadoras desta enfermidade (BENTO *et al.*, 1992).

Quanto a sua classificação, os triatomíneos encontram-se dentro do filo Artropoda, classe Insecta, ordem Hemíptera, família Reduviidae e sub-família Triatominae. Desta sub-família fazem parte mais de 123 espécies, todas potencialmente vetoras do *T.cruzi*. Felizmente, a maior parte destas espécies não tem participação direta na transmissão domiciliar da doença. Dos 15 gêneros existentes, *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* são os mais importantes sob o ponto de vista epidemiológico (LENT; WYGODZINSKY, 1979).

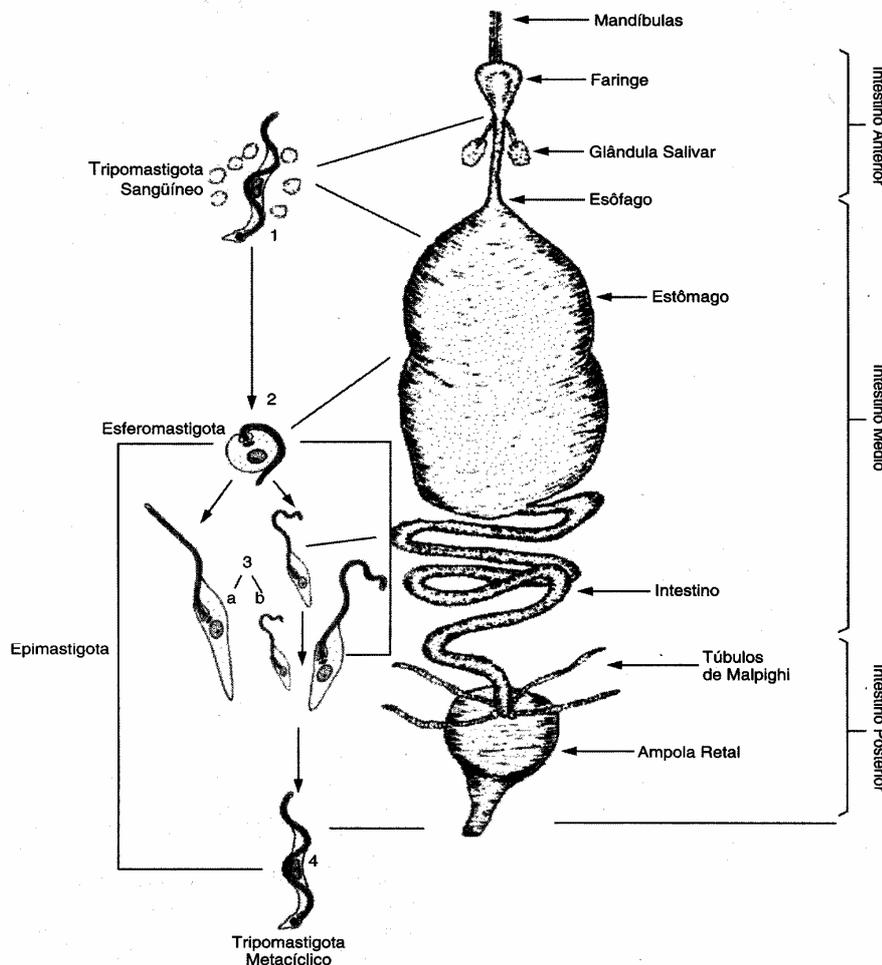
Os triatomíneos são insetos hemimetábolos, ou seja, apresentam metamorfose incompleta. Da eclosão da ninfa até chegar a fase adulta, os triatomíneos passam, através de mudas por cinco estádios de desenvolvimento, sendo todos vetores potenciais do *Trypanosoma cruzi* (Figura 1).



**A**  
**Figura 1-** Ciclo de vida dos triatomíneos. (0) ovo; (1) ninfa de primeiro estádio; (2) ninfa de segundo estádio; (3) ninfa de terceiro estádio; (4) ninfa de quarto estádio; (5) ninfa de quinto estádio: (A) adulto. Fonte: Superintendência do controle de endemias do estado de

Para o *Trypanosoma cruzi*, o hospedeiro invertebrado é essencial para a manutenção de seu ciclo de vida (BRENER, 1972; GARCIA; AZAMBUJA, 1991).

Este tem início quando o sangue de animais infectados com formas tripomastigotas sanguíneas é ingerido, durante o repasto sanguíneo pelo inseto (BRENER, 1972; GARCIA; AZAMBUJA, 1991). Ao chegar no estômago, as formas tripomastigotas se transformam em formas arredondadas chamadas esferomastigotas. Em seguida, estes parasitas migram para o intestino médio onde se transformam em epimastigotas, os quais se dividem e posteriormente migram para parte mais posterior, atingindo o reto. Lá estas formas se aderem e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas. Estes últimos são liberados na urina e nas fezes do inseto (ZELEDÓN, 1987; GARCIA; AZAMBUJA, 1991) (Figura 2), podendo ser transmitidas através da pele e mucosa ao hospedeiro vertebrado.

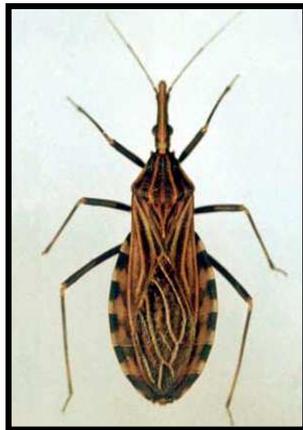


**Figura 2:** Ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado. **Fonte:**

A veiculação da doença de Chagas no ambiente domiciliar é resultado de diversas variáveis. É indispensável que o vetor esteja presente, infectado e colonizando a habitação humana. Tal situação está condicionada primariamente à existência de circunstâncias favoráveis a domiciliação dos vetores, como por exemplo, à ação do homem sobre o ambiente e os atributos do próprio vetor (FORANTTINI *et al.*, 1970).

### **1.1.1 *Rhodnius prolixus***

O gênero *Rhodnius* compreende 12 espécies conhecidas, todas eficientes vetoras do *T. cruzi*. O *R. prolixus* (Figura 3) foi uma das primeiras espécies deste gênero a ser descrita (STAL, 1859).



**Figura 3-** Adulto de *Rhodnius prolixus*.  
Fonte: Superintendência do controle de endemias do estado de São Paulo

A distribuição geográfica desta espécie é relativamente abrangente, ocorre em quase todos os países da América Central, com exceção do Panamá e Costa Rica. Destaca-se como o principal vetor natural do *T. cruzi* (DUJARDIN *et al.*, 1989; PONCE *et al.*, 1995; PAZ BAILEY *et al.*, 2002) na Venezuela e na Colômbia; e ao norte da América do sul. A importância epidemiológica de *R. prolixus* no Brasil não é grande; entretanto, pode aumentar com o desbravamento da região Amazônica, onde a espécie ocorre (ZELEDON, 1972). Além do mais esta espécie também foi encontrada no Estado de São Paulo (TAVARES, 1971) (Figura 4).



**Figura 4-** Distribuição geográfica de *Rhodnius prolixus* nas Américas

Vários fatores tornam o *R. prolixus* uma das mais importantes espécies vetoras do *T. cruzi*, tais como a sua acentuada antropofilia, rápido ciclo de desenvolvimento, elevada densidade, intensa dispersão, alta infectividade com um curto tempo entre o repasto e a dejeição, e a sua alta susceptibilidade para albergar o *T. cruzi*. Torna-se ainda mais importante por causa das elevadas taxas de infecção pelo *Trypanosoma rangeli* (AZAMBUJA *et al.*, 2005), o qual causa drásticas alterações no ciclo biológico

deste inseto impedindo a sua sobrevivência (GREWAL, 1957). Nos homens e outros mamíferos, o *T. rangeli* não é considerado patogênico (HERBIG-SANDEREUTER, 1957; AZAMBUJA *et al.*, 2005). Entretanto a infecção por este parasita pode levar a uma resposta imune humoral com elevados níveis de anticorpos, os quais induzem reações sorológicas cruzadas com o *T. cruzi*, dificultando desta forma o diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica. Além do mais, a coexistência deste parasita com o *T. cruzi* possibilita a ocorrência de infecções mistas tanto no hospedeiro invertebrado como no vertebrado (AZAMBUJA *et al.*, 2005).

*R. prolixus* vem sendo estudado há muitos anos, inicialmente para estudar a sua capacidade na utilização em xenodiagnóstico da tripanossomíase (BRUMPT, 1914), posteriormente como modelo clássico para estudos de fisiologia básica de insetos (WIGGLESWORTH, 1951; SCHOFIELD, 1994) ou ainda para compreender o sistema digestivo de hematófagos, tanto do ponto de vista estrutural, como funcional (BILLINGSLEY; DOWNE, 1989).

## **1. 2 Sistema imune dos insetos**

A maioria dos estudos realizados sobre o sistema imune de insetos tem sido focado principalmente em insetos de valor econômico e/ou em vetores tais como os mosquitos, nos quais os parasitas entram em contato direto com fatores da hemolinfa enquanto se movem do seu sítio de desenvolvimento ao aparelho bucal ou glândulas salivares de onde são transmitidos aos vertebrados. Na doença de Chagas, no entanto os parasitas nunca deixam o trato intestinal, e desta forma não há contato direto entre os parasitas e os hemócitos ou fatores da hemolinfa do triatomíneo vetor. Uma importante hipótese levantada por Lopes *et al.* (2003) afirma que embora ineficiente este modo de transmissão do *T. cruzi*, teria evoluído para evitar o contato letal com os fatores do sistema imune do hospedeiro. Assim, o estudo da imunidade deste inseto se justifica a partir da premissa de que através do conhecimento dos mecanismos que regem o sistema imune de *R. prolixus* podemos aumentar nossos conhecimentos sobre aspectos gerais da imunidade dos insetos, expandindo estes estudos para vetores que assumem diferentes modos de transmissão.

---

### **1. 2. 1 Hemolinfa**

Os insetos possuem um sistema circulatório aberto, ou seja, a hemolinfa flui livremente na cavidade corporal, entrando em contato direto com todos os órgãos e tecidos internos. A hemolinfa é um fluido que varia de descolorado a alaranjado e apresenta grande tendência a se tornar escura quando em contato com o ar, sob a influência de uma enzima, a tirosinase (CLEMENTS, 1992). É constituída fundamentalmente por duas partes: Uma líquida e outra sólida. Na parte líquida ocorrem trocas químicas entre os diferentes órgãos, veiculação de hormônios e enzimas (GARCIA *et al.*, 1979), carreamento de nutrientes a partir do intestino (CANAVOSO; RUBIOLO, 1998) e de produtos residuais para os órgãos de excreção (MADDRELL; GEE, 1974; MADDRELL; GARDINER, 1976). Além do mais, é responsável pela pressão interna do inseto, promovendo a transmissão da mesma de uma região para outra do corpo. Já a parte sólida, é formada por diferentes tipos celulares, os hemócitos, os quais divergem tanto na morfologia quanto na função.

Constituintes humorais e celulares da hemolinfa são fundamentais no processo da resistência dos insetos à infecção por microorganismos (RATCLIFFE; WALTERS, 1983).

### **1. 2. 2 Hemócitos**

Os hemócitos compreendem um complexo de vários tipos celulares de morfologias distintas que circulam livremente pela hemolinfa, podendo também ser encontrados associados a órgãos internos, tais como o corpo gorduroso, traquéia e o sistema digestivo (BEEMAN *et al.*, 1983).

Quanto a sua origem, a maioria dos autores concorda que se originam do mesoderma durante a embriogênese (HOFFMAN, 1970; HOFFMAN *et al.*, 1979, TEPASS *et al.*, 1994). Todavia, a origem pós-embriônica ainda é pouco esclarecida (LANOT *et al.*, 2001). Acredita-se que a manutenção do estoque dos hemócitos circulantes deva-se à existência de tecidos com função hematopoiética e/ou por divisão celular. Segundo Gardiner e Strand, (2000), em Lepidopteras há uma diferenciação de plasmatócitos no órgão hematopoiético, a partir de prohemócitos; enquanto que os outros tipos celulares só se diferenciam após os

---

plasmatócitos serem lançadas na circulação. Assim a manutenção das populações de hemócitos dependeria da continuada divisão de cada tipo celular na circulação.

Em triatomíneos, trabalhos sobre a origem dos hemócitos se limitam aos estudos realizados por Furtado *et al.* (1984). Estes autores identificaram a presença de um par de órgão hematopoiético, apenas em larvas de 5º estágio de *Panstrongylus megistus*. Todavia, como os hemócitos circulantes são mantidos, e qual a sua origem em outros estádios de desenvolvimento do inseto, são questões que precisam ser melhores esclarecidas.

A identificação dos hemócitos é essencial para se entender a resposta imune mediada por células nos insetos. A grande variedade destas células torna a sua classificação e identificação uma tarefa extremamente difícil gerando muitas controvérsias.

Tradicionalmente esta classificação é feita levando em consideração características morfológicas, histoquímicas e funcional (GUPTA, 1985; BREHELIM; ZACHARY, 1986). Porém, estas variam sob determinadas condições e pelos diversos critérios utilizados de forma não padronizada (GOTZ; BOMAN, 1985; LACKIE, 1988). Frequentemente, as várias formas de uma mesma célula são descritas como tipos celulares diferentes (BEEMAN *et al.*, 1983). Por outro lado, é comum os autores trabalharem com hemócitos provenientes de diferentes momentos do ciclo vital do inseto, o que dificulta de sobremaneira o trabalho de classificação. Soma-se a isto o fato dos hemócitos serem células extremamente instáveis (HYPSA; GRUBHOFFER, 1997) e difíceis de distinguir sob condições nas quais não estejam espalhadas sobre uma superfície (GILLESPIE *et al.*, 1997).

A busca por marcadores moleculares, como lectinas, tem sido intensamente explorada, na tentativa de diferenciar os tipos de hemócitos (MCKENZIE; PRESTON, 1992), porém esta aplicação é bastante limitada, devido ao fato destas lectinas também reconhecerem carboidratos encontrados em outros tecidos. Outra técnica que tem sido aplicada com sucesso nos últimos anos, em várias espécies de insetos, deve-se ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais (CHAIN *et al.*, 1992; MULLETT *et al.*, 1993; STRAND; JOHNSON, 1996; TRENCZEK; BENNICH, 1990; WILLOTT *et al.*, 1994). Em adição a estes anticorpos monoclonais, a identificação dos hemócitos tem sido feita de acordo com a atividade enzimática específica destas células, utilizando-se protease, fosfatase ácida, fenoloxidase, peroxidase e esterase (HILLYER *et al.*, 2003). A laranja de acridina e o iodeto de

---

propídio têm sido também recentemente introduzidos como marcadores de vários tipos de hemócitos circulantes em *Bombyx mori* (LING *et al.* 2003b; LING *et al.* 2005).

Em triatomíneos, os hemócitos foram classificados inicialmente na hemolinfa de *Rhodnius prolixus*, por Wigglesworth (1933), e posteriormente uma investigação mais detalhada, usando microscópio de contraste de fase por Jones (1965). Segundo Barraco *et al.* (1987) os hemócitos encontrados na hemolinfa de *Panstrongylus megistus* são: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, oenocitóides e adipohemócitos. Estes tipos celulares se caracterizaram por apresentarem morfologia distinta entre eles, como também por possuírem diferentes funções nem todas ainda conhecidas. Posteriormente estes mesmos autores encontraram mais um tipo celular, os coagulócitos (BARRACO *et al.*, 1987). Hypsa e Grubhoffer (1997) utilizando microscopia eletrônica descrevem os seguintes tipos em *Triatoma infestans*: prohemócitos I e II, plasmatócitos, células reticulares, adipócitos, oenocitóides e um último tipo caracterizado por conter no interior de seu citoplasma, organismos simbiotes na forma de cocos e bacilos. Azambuja *et al.* (1991), classificaram os hemócitos de diferentes espécies de triatomíneos. A distribuição destes tipos celulares nas espécies analisadas variou, não sendo verificada a presença de certos hemócitos em algumas destas espécies. Em *R. prolixus* estes autores encontraram sete tipos de hemócitos: prohemócitos, plasmatócitos, células gigantes, granulócitos, cistócitos, oenocitóides e “spindle cells”.

Nos insetos os hemócitos desempenham várias funções, tais como: transporte de lipídeos e proteínas, reparação e formação de tecidos, destacando-se principalmente no reconhecimento do próprio e do não-próprio e na participação nos mecanismos de defesa e imunidade celular (LACKIE, 1988; HAM, 1992; GILLESPIE *et al.*, 1997; LAVINE; STRAND, 2002).

### **1. 2. 3 Mecanismos de defesa dos insetos**

Os insetos ocupam diferentes nichos ecológicos, estando constantemente expostos a vários microorganismos e partículas estranhas. Conseqüentemente, durante a evolução, eles desenvolveram um complexo e eficiente sistema biológico de defesa, capaz de protegê-los contra estes invasores. Estes mecanismos de defesa incluem barreiras mecânicas e fisiológicas. A primeira é constituída

---

principalmente pelo tegumento (GULLAN; CRANSTON, 1994), que além de proteção mecânica evita que haja perda excessiva de água e também forma uma barreira efetiva contra a entrada de patógenos. A segunda envolve uma grande variedade de respostas celulares e humorais, que são desencadeadas caso haja a entrada de microorganismos e/ou partículas estranhas na hemolinfa.

Comparando com os mamíferos, os insetos não possuem uma imunidade adquirida nem memória imunológica. Suas respostas fisiológicas dependem apenas da imunidade inata, a qual inclui basicamente dois mecanismos: a) Mecanismos humorais, tais como a indução da síntese de moléculas citotóxicas como peptídeos e proteínas antimicrobiais (HOFFMANN *et al.*, 1993; MEISTER *et al.*, 2000; LOWENBERGER, 2001), radicais livres derivados do oxigênio e nitrogênio (BOGDAN *et al.*, 2000; VASS; NAPPI, 2001) e a ativação da cascata proteolítica (MUTA; IWANAGA, 1996; GILLESPIE *et al.*, 1997); b) mecanismos celulares, os quais envolvem mudanças na população dos hemócitos, bem como mudanças no seu estágio e comportamento (GILLESPIE *et al.*, 1997), resultando desta forma em respostas coordenadas de várias subpopulações destes hemócitos.

### **1. 2. 3. 1 Resposta imune humoral**

A resposta imune humoral se caracteriza pela indução de moléculas antimicrobianas na hemolinfa, uma vez que esta tenha sido invadida. Uma grande variedade destas moléculas já foi identificada e caracterizada, sendo efetivas contra uma grande classe de microorganismos (COCIANCICH *et al.*, 1994). Elas são produzidas principalmente pelas células do corpo gorduroso. Hemócitos, células pericardiais dos túbulos de Malpighi e do tubo digestivo também têm uma pequena participação na produção destas proteínas e peptídeos antimicrobianos (GILLESPIE *et al.*, 1997). As moléculas antimicrobianas são peptídeos ou proteínas classificadas em diferentes famílias, distintas entre si, de acordo com a seqüência de aminoácidos e a estrutura tridimensional; mas comum quanto a atuação em algum passo da resposta imune dos insetos. Dentre estas famílias podemos citar as cecropinas, defensinas (ricas em cisteína), peptídeos ricos em glicina, peptídeos ricos em prolina, drosomicina, entre outras (COCIANCICH *et al.*, 1994).

---

---

Os níveis relativos da expressão destas moléculas dependem da classe de hemócitos, bem como do tipo de desafio imunológico (LAVINE *et al.* 2005). Algumas destas proteínas e peptídeos antimicrobianos são expressos constitutivamente na hemolinfa, independente de infecção. Enquanto que outros são expressos em baixos níveis e induzidos após um desafio imunológico, ou ainda aqueles que só são expressos na presença de um patógeno ou corpo estranho (HOFFMANN, 1995; GILLESPIE *et al.*, 1997).

O modo de ação destas proteínas e peptídeos é bastante variado, apresentando um amplo espectro de atividades, sendo capazes de imobilizar e matar organismos invasores (MORTON *et al.*, 1987; LAVINE; STRAND, 2002). Apresentam normalmente alvos preferenciais, como por exemplo, a drosomicina que é essencialmente antifúngica. Já as defensinas são ativas contra bactérias Gram+, e as atacinas, drosocinas e dipterocinas são efetoras contra bactérias Gram-. As cecropinas têm efeito tanto para bactérias Gram+ quanto para Gram - (LEMAITRE *et al.*, 1995). Nenhum destes peptídeos são citotóxicos para os insetos nas concentrações encontradas na hemolinfa (HETRU *et al.*, 2003).

Vários estudos têm demonstrado a relação entre alimentação e função imune, sendo a produção de peptídeos antimicrobianos dependente diretamente de reservas do corpo gorduroso (HETRU *et al.*, 1998). Em *R. prolixus* foi observado que insetos não alimentados tinham baixa produção de peptídeos e proteínas antimicrobianas, redução na atividade da lisozima e na formação de nódulos, diminuição do número de hemócitos, e conseqüentemente uma baixa resistência contra bactérias (AZAMBUJA *et al.*, 1997).

Existem basicamente duas vias distintas de sinalização que controlam a defesa imune de insetos e a indução de vários mecanismos antimicrobianos, a via Toll e Imd (HETRU *et al.*, 2003). O papel da via Toll na resposta imune é particularmente importante durante a infecção por fungos e bactérias Gram +. Ela é responsável pela indução de peptídeos, bem como a ativação dos hemócitos (MIZUGUCHI *et al.*, 1998). A via Imd é ativada pela infecção por bactérias Gram-, e a partir daí há a indução de peptídeos antibacteriais como a dipterocina, cecropina, drosomicina.

Um importante mecanismo da resposta imune humoral é a ativação de cascatas proteolíticas, que leva a coagulação e melanização da hemolinfa (CERENIUS; SODERHALL, 2004). Dentre elas podemos destacar a cascata da fenoloxidase, que

irá promover a deposição de melanina sobre o organismo invasor, imobilizando-o e/ou impedindo a progressão da infecção e posteriormente promovendo a sua eliminação da hemolinfa (BEUTLER, 2004). Outra cascata proteolítica de suma importância na resposta imune humoral é a cascata da coagulação da hemolinfa, a qual permite que microorganismos sejam imobilizados através de um gel insolúvel chamado coagulina, que se forma ao redor dos mesmos, levando a morte e degradação destes microorganismos pela ação de várias substâncias antimicrobiais (MUTA; [IWANAGA, 1996](#)).

### **1. 2. 3. 2 Resposta imune celular**

As reações de defesa celular em insetos são conhecidas há mais de 100 anos. Estas respostas envolvem a interação direta entre patógenos e hemócitos. Logo após a penetração do organismo invasor na hemolinfa, os hemócitos reconhecem diretamente estes organismos pela interação de seus receptores de superfície com moléculas do patógeno, ou indiretamente, através do reconhecimento de receptores humorais que opsonizam a superfície do invasor (LAVINE; STRAND, 2002).

A resposta imune celular pode ser dividida em três mecanismos distintos: fagocitose, encapsulamento e formação de nódulos (SALT, 1970; RATCLIFFE; ROWLEY, 1979). O tipo de mecanismo desencadeado varia consideravelmente com o tipo do invasor, contudo a resposta celular predominante em insetos é a fagocitose e o encapsulamento (LAVINE; STRAND, 2002).

#### **1. 2. 3. 2. 1 Fagocitose**

A fagocitose é uma das mais conservadas das respostas celulares, sendo mais intensamente estudada em macrófagos de mamíferos (ADEREM; UNDERHILL, 1999), o que vem esclarecendo o papel de alguns fatores que regulam este complexo processo (GARIN *et al.*, 2001; MAY; MACHESKY, 2001). Este mecanismo é essencial na defesa contra infecção por microorganismos, bem como na retirada de células apoptóticas durante o desenvolvimento (ADEREM; UNDERHILL, 1999; GREENBERG; GRINSTEIN, 2002).

---

---

Nas células de mamíferos dependendo da natureza da partícula a ser fagocitada, bem como do receptor envolvido no seu reconhecimento (SWANSON; BAER, 1995), a fagocitose pode ser dividida em 3 mecanismos principais, tais como: fagocitose tipo “zipper”, “trigger” e macropinocitose.

A fagocitose tipo “zipper” é mediada via receptor Fc e depende da fixação da partícula a este receptor. Tal reconhecimento resulta na formação de um pseudópodo, o qual é proporcional ao tamanho da partícula a ser fagocitada, e se coloca bastante próximo e se estende junto à partícula somente até onde sua superfície tem ligantes para tais receptores. A membrana do fagossoma em formação é justaposta à partícula (SWANSON; BAER, 1995). A fagocitose do tipo “trigger” é mediada essencialmente via receptores do complemento. As partículas parecem afundar diretamente dentro da célula ou há a formação de um pequeno pseudópode a partir da superfície desta célula. O fagossoma é mais ou menos aderente a partícula (COSTA *et al*, 2005).

Já na macropinocitose, não há contato entre a superfície da partícula e a membrana plasmática do fagócito. É um processo independente de receptor, porém dependente de actina (ALPUCHE-ARANDA *et al.*, 1994) levando à formação de um grande pseudópode, o qual engloba a partícula juntamente com fluido extracelular. Os fagossomos formados são bastante espaçosos e podem se tornar aderente à partícula (COSTA *et al*, 2005).

A fagocitose é tida como uma reação de defesa primária dos hemócitos de insetos contra corpos estranhos (RATICLIFFE; ROWLEY, 1979; Kurtz, 2002) particularmente partículas grandes, que podem ser bióticas, como bactérias, leveduras, células apoptóticas; ou abióticas tais como partículas de látex, nanquim, fio de nylon, entre outros (HERNANDEZ *et al.*, 1999; DA SILVA *et al.*, 2000b). Este processo pode ser mediado por receptores (BAYNE, 1990); visto que, envolve geralmente adesão, reconhecimento, transdução de sinal, ativação e formação de pseudópodos, e por fim ingestão e digestão do material fagocitado.

Em triatomíneos informações sobre este processo no tocante aos tipos celulares envolvidos e o seu papel na defesa contra microrganismos, ainda permanecem praticamente inexistentes. Estudos recentes demonstraram que durante a infecção de *R. prolixus* por *T. rangeli*, várias formas epimastigotas deste parasita foram observadas no interior de vacúolos fagocíticos de plasmatócitos, demonstrando que

estes insetos são capazes de montar uma resposta celular contra o parasita (OLIVEIRA; DE SOUZA, 2003)

As células predominantemente fagocíticas em insetos são os plasmatócitos e os granulócitos (RATCLIFFE; ROWLE, 1979; WAGO, 1991), estes podem agir em conjunto (GOTZ & VEY, 1974) ou separadamente (RIBEIRO *et al.*, 1996; VILCINSKAS *et al.*, 1997). Em algumas espécies de insetos podem haver diferenças quanto a estes tipos de hemócitos fagocíticos (ANGGRAENI; RATCLIFFE, 1991; TOJO *et al.*, 2000), porém estas diferenças, deve-se em parte a grande dificuldade de identificação dos mesmos.

Alguns fatores microbianos podem aumentar a velocidade fagocítica dos hemócitos (HUXHAM; LACKIE, 1988). Por outro lado, a fagocitose pode ser estimulada pela ativação da cascata da profenoloxidase, como também pela ação de algumas lectinas com atividade de opsonina. Assim sendo, o fenômeno fagocítico depende das características da superfície do invasor e dos hemócitos, bem como das condições experimentais.

### **1. 2. 3. 2. 2 Encapsulamento**

O encapsulamento é o mecanismo de defesa celular dos insetos contra partículas estranhas cujo tamanho é superior as que disparam o processo fagocítico. Ocorrem normalmente contra protozoários, parasitas, nematóides, fungos, ovos e larvas de parasitóides (SALT, 1970; STRAND; PECH, 1995; LAVINE; BECKAGE, 1995), como também contra partículas abióticas. Alguns patógenos podem desenvolver numerosos mecanismos que suprimem o encapsulamento, por interferirem em algum passo deste processo.

Nos insetos, observa-se dois tipos de encapsulamento: encapsulamento celular não melanótico e o encapsulamento celular melanótico ou melanização (GOTZ, 1986). O encapsulamento celular ocorre com a participação dos hemócitos, sem que haja necessidade de algum sinal de melanização (NAPPI *et al.*, 2005). Em contraste, o encapsulamento melanótico é um mecanismo mais complexo, similar ao sistema complemento dos mamíferos, requer a participação e coordenação dos hemócitos e de várias proteínas da hemolinfa, incluindo componentes do sistema de ativação da fenoloxidase (PO) e alguns receptores de reconhecimento padrão (LING; YU, 2005).

---

A formação da melanina é catalisada pela PO, a qual é encontrada em sua forma inativa sob a forma de Zimogênio, a pro-phenoloxidase (ProPO) localizada nos hemócitos. A ativação da ProPO é mediada por uma cascata de serina proteases. A PO ativa se deposita na superfície das partículas estranhas e na superfície dos hemócitos, levando a formação de agregados. (HILLYER *et al*, 2004). Esta enzima cataliza a hidroxilação da tirosina a 3,4-hidroxi-penilalanina (Dopa) e a oxidação de substâncias fenólicas a quinonas, produzindo pigmento negro como resultado. A melanina e vários compostos intermediários formados durante o sistema de ativação da PO são citotóxicos tanto para o inseto quanto para o patógeno (MEISTER *et al.*, 2000), assim, a ativação da ProPO deve ser fortemente regulada e localizada. Têm sido demonstrados que imunolectinas, as quais funcionam como receptores de reconhecimento padrão (RRP) aumentam o encapsulamento e a melanização “in vitro”. A participação de imunolectinas no encapsulamento e melanização pode ser atribuída a sua habilidade de reconhecer e ligar-se a padrões moleculares associados a patógenos (PMAP). (LING; YU, 2005)

Têm sido demonstrados em várias espécies de insetos que o encapsulamento envolve basicamente dois tipos de hemócitos, os plasmatócitos e granulócitos (STRAND; PECH, 1995). Os hemócitos são recrutados ao local e a partir daí formam uma cápsula ao redor do invasor. O desenvolvimento das cápsulas celulares se dá normalmente pela adesão de granulócitos à partícula invasora, onde a partir daí ocorre a liberação de componentes quimiotáticos que atraem os plasmatócitos. Estes por sua vez, vão se aderindo formando uma placa espessa e multicelular com várias camadas (PECH; STRAND, 1996). Geralmente a camada mais interna da cápsula tem a capacidade de melanizar, a partir da desintegração de seus hemócitos (RATCLIFFE *et al.*, 1985; GOTZ, 1986), contribuindo desta forma para a morte do invasor. Sugere-se que existam moléculas receptoras na superfície dos hemócitos que irão favorecer a sua adesão ao microorganismo a ser encapsulado, bem como estimular a ativação da cascata da fenoloxidase (PECH; STRAND, 1995).

### **1. 2. 3. 2. 3 Nodulação**

A formação de nódulos refere-se a um tipo de resposta imune celular dos insetos a um grande número de microorganismos neutralizando-os (DA SILVA *et al.*, 2000).

---

Estes nódulos envolvem a acumulação de uma estrutura amorfa, contendo agregados hemocíticos multicelulares, células em degeneração e materiais extracelulares, os quais podem envolver um grande número de microorganismos, tais como bactérias, dentro de uma matriz mucopolissacarídea (MIRANPURI *et al.*, 1991). Sua formação pode ser induzida por lipopolissacarídeos, algumas glicoproteínas, dentre outras substâncias (LACKIE, 1988). Alguns nódulos podem ser eventualmente encapsulados. Os hemócitos envolvidos na formação de nódulos são os mesmos associados à fagocitose e ao encapsulamento, ou seja, plasmatócitos e granulócitos (PASKEWITZ; CHRISTENSEN, 1996).

A formação de nódulos e o encapsulamento apresentam poucas diferenças entre si, podendo ser idênticos a nível ultraestrutural (RATCLIFFE; GAGEN, 1976, 1977) sendo constantemente confundidos. Acredita-se que ambos são essencialmente o mesmo processo, contra alvos diferentes, e que ocorram sempre que grande quantidade de material estranho invade a hemocele e a fagocitose não é efetiva para a sua eliminação (RATCLIFFE; ROWLEY, 1979).

Uma comparação entre fagocitose e encapsulamento, mostra que este último é mais complexo em vários aspectos, tais como a necessidade de uma sinalização intracelular mais ampla, cooperação de mais de um tipo de hemócito, etc.

Os constituintes humorais e celulares da hemolinfa são desta forma, fundamentais no processo de resistência dos insetos à infecção. O tipo de reação imune desencadeada na hemolinfa do inseto quando em contato com o invasor, dependerá do tamanho, do número e, sobretudo da patogenicidade do invasor (RATCLIFFE; WALTERS, 1983). Além disso, a resposta humoral e celular estão ligadas, já que muitos fatores humorais afetam funções dos hemócitos, e estes últimos são fontes importantes de muitas destas moléculas.

Tendo em vista a precariedade de estudos sobre a resposta imune em triatomíneos no que diz respeito aos tipos celulares envolvidos e o seu papel na defesa contra microorganismos, o presente estudo visa esclarecer aspectos da imunidade celular de *R. prolixus* sob o ponto de vista morfológico e funcional bem como aumentar os conhecimentos sobre a ultra-estrutura e fisiologia de insetos vetores.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Caracterizar a resposta imune celular em *Rhodnius prolixus*, sob o ponto de vista morfológico, funcional e ultraestrutural.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar através de microscopia óptica e eletrônica, os diferentes tipos de hemócitos circulantes em *R. prolixus*;
  - Analisar a dinâmica hemocitária em *R. prolixus* normais e desafiados imunologicamente;
  - Analisar a resposta fagocítica de hemócitos em *R. prolixus*, frente a partículas abióticas e bióticas.
- 
-

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3. 1 Colônia de triatomíneos

Triatomíneos da espécie *Rhodnius prolixus*, foram mantidos em estufa B.O.D. a uma temperatura de aproximadamente 27°C, sob uma umidade relativa de 60 – 70%, em frascos de vidro com o fundo forrado com papel de filtro, com uma cortina perfurada de cartolina em seu interior, a fim de aumentar a superfície do frasco, bem como mimetizar o seu ambiente natural. Os insetos nos diferentes estádios de desenvolvimento foram alimentados quinzenalmente em galinhas, em tempo necessário para o completo ingurgitamento. 20 ninfas no 5º estágio de *R. prolixus* com quatro dias após a alimentação foram utilizadas em todos os experimentos.

#### 3. 2 Coleta da hemolinfa

A hemolinfa foi coletada com auxílio de uma micropipeta, através de uma pequena perfuração na região lateral do tórax do inseto e colocada diretamente em eppendorff contendo fixador (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2), com exceção do experimento “in vitro”. Todo este procedimento foi realizado a uma temperatura de 4°C.

#### 3. 3 Fagocitose de partículas abióticas

10 µl de partículas de látex (Sigma, USA) de 0,33 µm de diâmetro (solução aquosa, 10% de conteúdo sólido) foram diluídas na proporção de 1:10 em PBS estéril, pH 7,2 e injetadas na cavidade intratorácica de ninfas de 5º estágio, com o auxílio de uma seringa Hamilton 26 Gauge. Após 30, 60, 120 minutos, a hemolinfa foi coletada e os hemócitos foram processados para microscopia eletrônica de transmissão. A porcentagem relativa dos hemócitos foi estimada através da contagem diferencial.

---

### **3. 4 Fagocitose de partículas bióticas**

Com objetivo de se verificar o tipo de resposta montada contra bactéria Gram+ e Gram- em *R. prolixus*, culturas contendo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, mantidas a 37°C em ágar e meio BHI, respectivamente, foram ressuspensas em PBS, pH 7,2 e inoculadas diretamente na hemocele do inseto, numa concentração de aproximadamente  $2 \times 10^8$  bactéria/ml, em um volume de 10µl. Após 30, 60 e 120 minutos, a hemolinfa foi coletada e os hemócitos foram processados para microscopia eletrônica de transmissão. Contagens diferenciais foram realizadas, como descrito abaixo.

### **3. 5 Contagem diferencial**

A hemolinfa proveniente dos experimentos de fagocitose foi coletada como descrito no item 3. 2, e colocada sobre uma lâmina, fazendo-se um esfregaço. Após secagem a temperatura ambiente, esta lâmina foi corada pela técnica da hidrólise ácida e então montada sob uma lamínula com entellan. A contagem diferencial foi realizada, utilizando como parâmetro a morfologia das células, através de microscópio óptico convencional de campo claro. Foram analisados 20 campos escolhidos aleatoriamente em cada lâmina. As contagens foram feitas em triplicata, tirando-se a média final de cada grupo. Insetos não inoculados foram utilizados como controle.

### **3. 6 Microscopia eletrônica de transmissão**

Amostras da hemolinfa de insetos inoculados com partículas abióticas e bióticas foram coletadas como descrito no item 3. 2, centrifugadas e os hemócitos obtidos foram fixados em 2,5% de glutaraldeído em Tampão Cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 1 hora, à 4°C. Em seguida o material foi lavado 3x no mesmo tampão e pós-fixado em uma solução contendo 1% de OsO<sub>4</sub>, 0,8% de ferricianeto de Potássio, 5 mM de CaCl<sub>2</sub> em Tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2, por 1 hora no escuro. Após a pós-fixação os hemócitos foram lavados 3x no mesmo tampão, desidratados em séries crescentes de acetona, incluídos em resina Epóxi (Sigma, USA). Cortes

---

ultrafinos foram obtidos, corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109B.

### **3. 7 Laranja de acridina**

Para melhor caracterizarmos os diferentes tipos de hemócitos, bem como verificarmos a presença de compartimentos acídicos através da microscopia óptica, a hemolinfa foi coletada diretamente em eppendorf contendo meio Grace e centrifugada para concentração dos hemócitos. Estes foram então incubados em uma solução de 20 µg/ml de laranja de acridina diluída em meio Grace por 20 minutos a uma temperatura de 28°C no escuro. Posteriormente os hemócitos foram lavados três vezes no mesmo meio e colocados em placas de cultivo Mattek 35mm (Mattek, USA), permanecendo na estufa por 20 minutos. Após este período foram observados ao microscópio confocal Leica AOB S PII. As imagens foram adquiridas utilizando os lasers ArKr (488nm e.m.) e HeNe (453nm e.m.).

Com objetivo de verificarmos a fagocitose in vitro, partículas de látex acopladas à FITC foram diluídas em meio Grace, na proporção de 1:10 e adicionadas às placas contendo hemócitos de *R. prolixus*. Imediatamente após a adição, as imagens foram adquiridas em tempo real, utilizando laser ArKr (488 nm e.m.) e contraste diferencial.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização morfológica dos hemócitos de *Rhodnius prolixus*

Através da análise por microscopia óptica convencional e eletrônica de transmissão, seis tipos de hemócitos foram identificados na hemolinfa de *R. prolixus*: prohemócitos, plasmatócitos, oenocitóides, adipohemócitos e granulócitos I e II. Estes últimos não puderam ser discriminados por microscopia convencional, apenas por MET. Em insetos não desafiados, os plasmatócitos, seguidos pelos prohemócitos, foram os tipos celulares mais encontrados. As células menos freqüentes foram os oenocitóides, granulócitos e adipohemócitos (Gráfico 1).

#### a) Prohemócitos

Os prohemócitos são células pequenas com aproximadamente 6 a 9  $\mu\text{m}$ , esféricas, com pequena quantidade de citoplasma e um núcleo grande, arredondado e com aspecto eucromático (Figuras 5A e 6A). O citoplasma é caracterizado por uma baixa concentração de organelas, podendo-se observar retículo endoplasmático liso e rugoso e poucas mitocôndrias distribuídas pela célula (Figuras 6A).

#### b) Plasmatócitos

Os plasmatócitos medem cerca de 10 a 28  $\mu\text{m}$ , são bastante polimórficos, variando de arredondados a alongados (Figuras 5B, 6B e C). O núcleo ocupa posição periférica ou central, bastante polimórfico e ocasionalmente bilobado (Figuras 6B), as vezes a cromatina apresenta-se condensada próxima a membrana nuclear (Figura 6B). Em outras a mesma apresenta-se mais dispersa e um nucléolo pode ser observado (Figura 6C). O citoplasma mostrou presença de um pequeno número de grânulos com diferentes eletrondensidades, pequenas vesículas indicativas de atividade endocítica (Figura 6B), um grande número de mitocôndrias alongadas, retículo endoplasmático, bem como complexo de Golgi (Figuras 6B e C). Foi possível observar na superfície de alguma destas grandes projeções da membrana plasmática (Figura 6B).

#### c) Oenocitóides

Os oenocitóides apresentaram características bem particulares, facilitando a sua diferenciação dos demais tipos de hemócitos, através da coloração pela hidrólise ácida, com uma coloração rosácea, tanto no núcleo, quanto no

---

citoplasma (Figura 5E). Através da microscopia eletrônica de transmissão os oenocitóides apresentaram-se como células esféricas ou ovaladas, medindo cerca de 9 a 11  $\mu\text{m}$  e com um núcleo ovalado (Figura 6D). O citoplasma é denso e homogêneo com presença de muitas vesículas eletrondensas de tamanho regular e algumas eltronlucentes. Um pequeno número de mitocôndrias, bem como poucos perfis de retículo endoplasmático foram observados (Figura 6D). Ocasionalmente estas células se encontravam no interior de outras células semelhantes a plasmatócitos (Figura 7A).

d) Granulócitos I e II

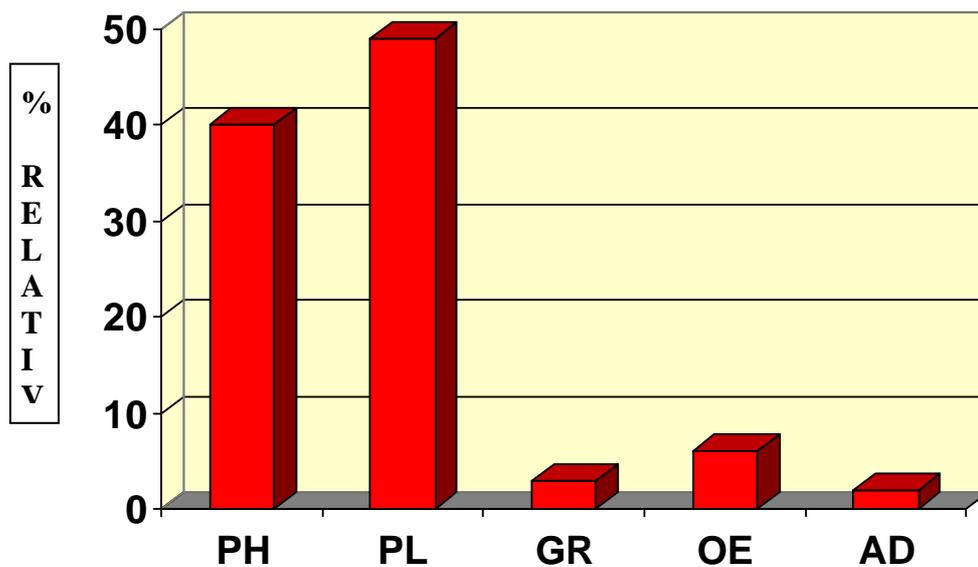
Os granulócitos são células relativamente grandes, com aproximadamente 10 a 28  $\mu\text{m}$ . Os granulócitos tipo I apresentam forma variada, que vai de arredondada a ovalada (Figuras 5C e 8A). O núcleo é irregular e está geralmente localizado na região central, com um nucléolo bem evidente (Figura 8A). O citoplasma possui uma grande quantidade de grânulos de diferentes tamanhos e eletrondensidades (Figura 8A). Alguns destes grânulos apresentam um arranjo de estruturas microtubulares em seu interior (Figura 8B). Outras organelas, tais como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi também foram observadas. Os granulócitos não apresentam a mesma capacidade de espalhamento dos plasmatócitos, contudo, são capazes de emitir algumas projeções citoplasmáticas (Figura 8A).

O granulócito do tipo II (Figuras 5D e 8C) é bastante semelhante ao granulócito I, porém seus grânulos apresentam diferenças quanto à forma, tamanho e localização. Estes são sempre encontrados na periferia da célula, onde chegam a deformar a membrana plasmática e alguns apresentam estrutura paracristalina não envolvidos por membranas (Figuras 8C e D). O núcleo é um pouco deslocado e o citoplasma é mais denso, e com menos organelas do que o do granulócito I. Poucas mitocôndrias, bem como retículo endoplasmático foram observados. Nestas células pode-se também observar projeções citoplasmáticas (Figura 8C).

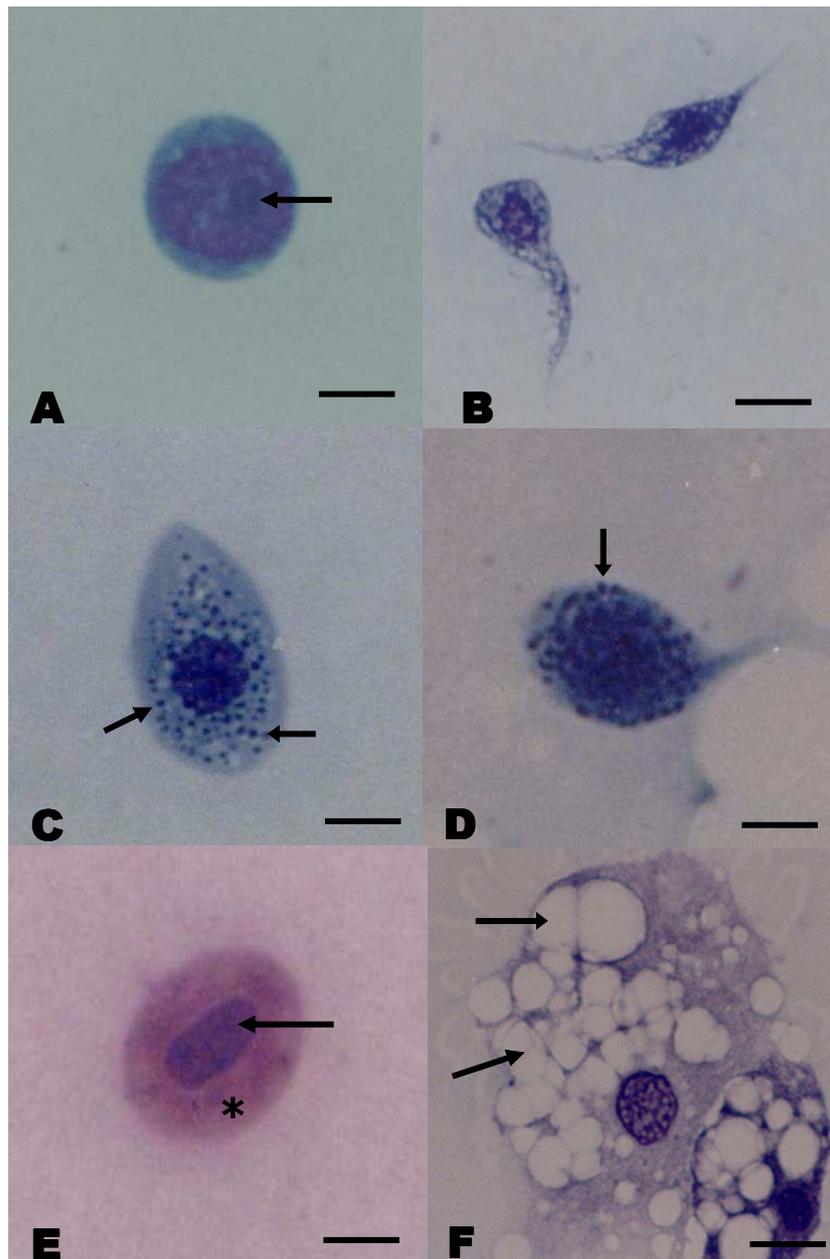
e) Adipohemócitos

Os adipohemócitos são os maiores tipos celulares encontrados na hemolinfa de *R. prolixus*, variando de 24 a 90  $\mu\text{m}$ . São células arredondadas, apresentam um núcleo pequeno e geralmente excêntrico (Figura 5F). O citoplasma é bastante característico, com a presença de um grande número de grandes inclusões

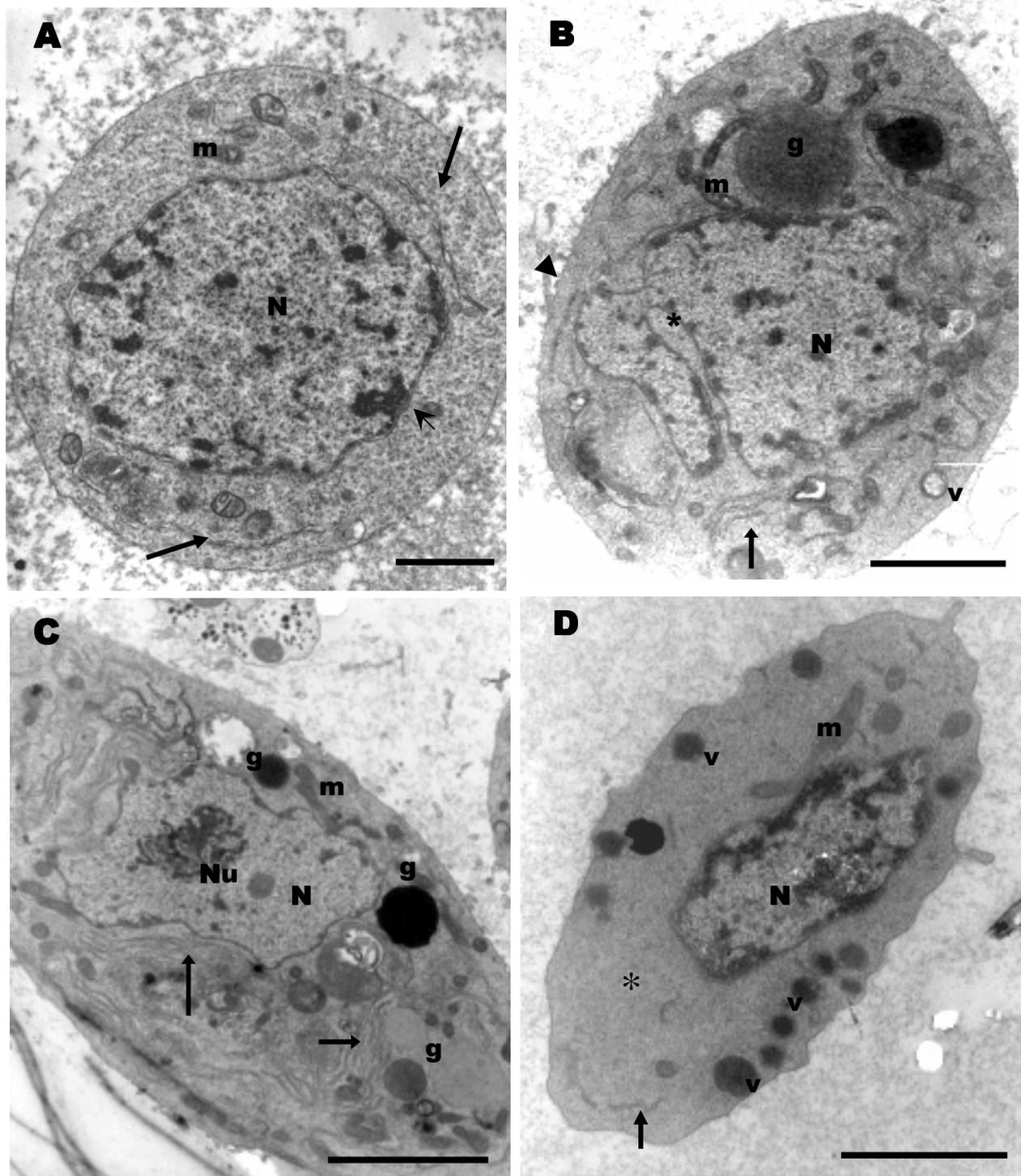
lipídicas (Figuras 5F, 7B e C), muitas mitocôndrias e perfis de retículo endoplasmático. Uma alta concentração de grânulos de glicogênio espalhada pelo citoplasma também foi observada (Figura 7C).



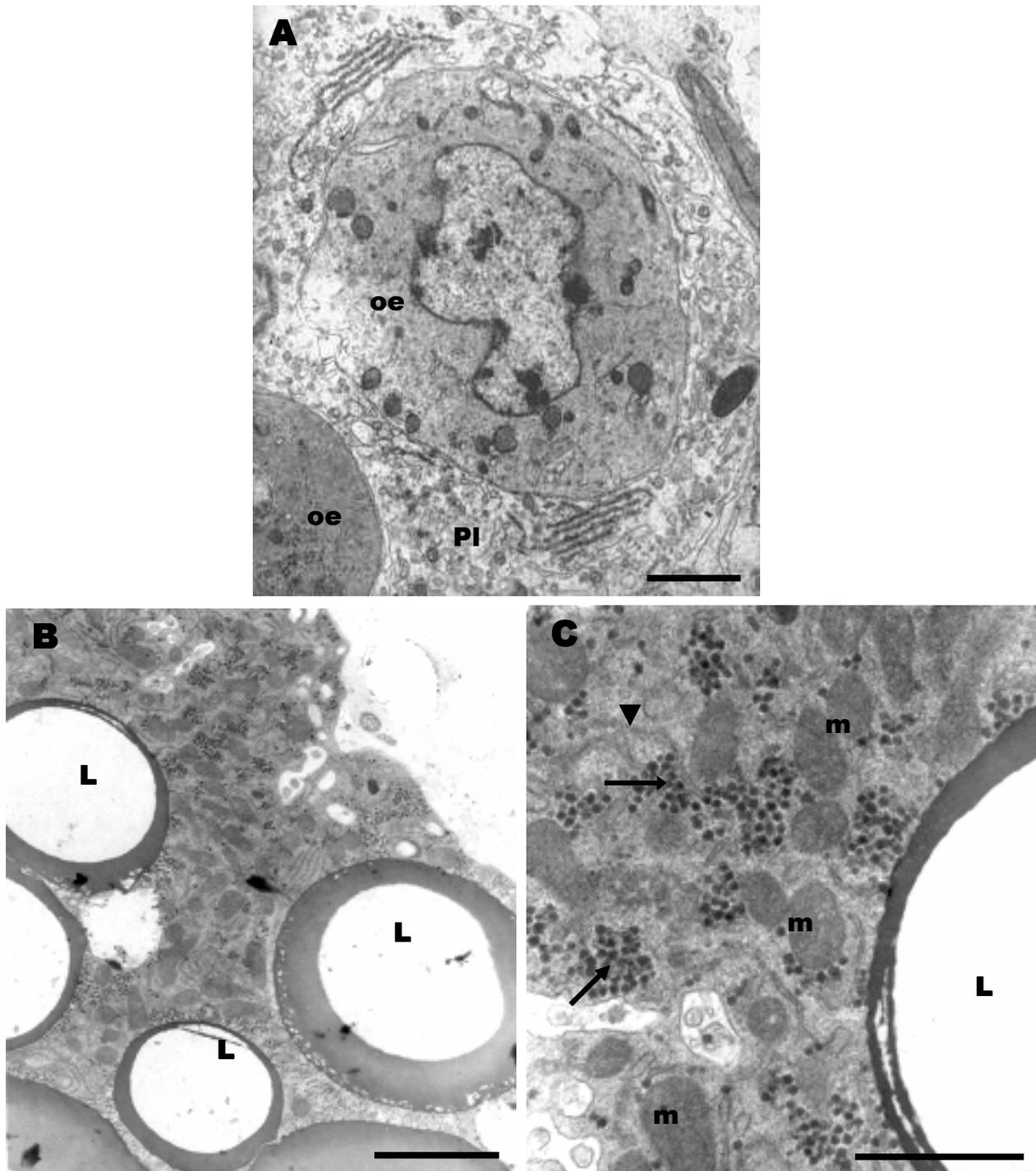
**Gráfico 1-** Porcentagem relativa dos tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa de *Rhodnius prolixus* não desafiados. PH, prohemócitos; PL, plasmatócitos; GR, granulócitos; OE, oenocitóides; AD, adipohemócitos.



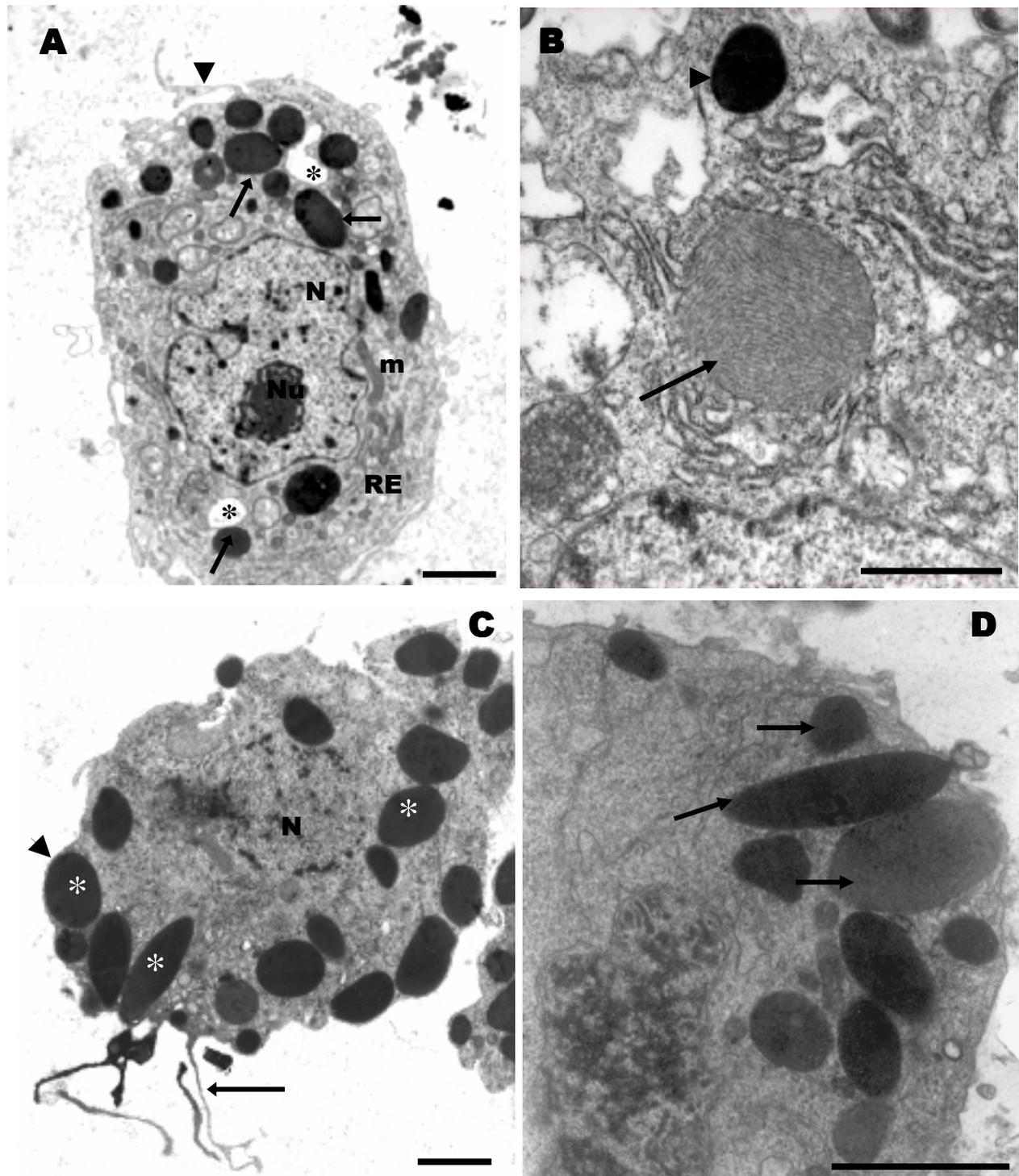
**Figura 5-** Microscopia óptica de campo claro de hemócitos não desafiados de *Rhodnius prolixus*, corados pela técnica de hidrólise ácida. **A)** Prohemócito com citoplasma delgado e um núcleo grande (seta). **B)** Plasmatócitos apresentando diferentes formas. **C) E D)** Granulócitos com a presença de vários grânulos no seu citoplasma (setas). **E)** Oenocitóide apresentando um núcleo central e elíptico (seta), citoplasma homogêneo (\*) e presença de vesículas. **F)** Adipohemócito mostrando grande número de inclusões lipídicas (seta). Pode-se notar uma nítida diferença de tamanho desta célula, comparando-se com as demais. Barras: A–3µm



**Figura 6-** Fotomicrografias eletrônica de transmissão mostrando os diferentes tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa de *R. prolixus*. **A) Prohemócito** com núcleo (N) ocupando a maior parte da célula, com a heterocromatina próxima a membrana nuclear (cabeça da seta). O citoplasma pobre em organelas, com algumas mitocôndrias (m) e perfis de retículo endoplasmático (setas). **B) e C) Plasmatócitos** com núcleo (N) polimórfico, podendo ou não ser bilobado (\*), com ou sem nucléolo (Nu). O citoplasma apresenta mitocôndrias (m), Retículo endoplasmático (setas) e alguns grânulos (g) e vesículas (v). Também é possível observar projeções da membrana plasmática (cabeça da seta). **D) Oenocitóide** com núcleo (N) presente, citoplasma homogêneo (\*) com a presença de várias vesículas (v), algumas mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático (seta). Barra: 1 µm



**Figura 7-** Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de *Rhodnius prolixus*. **A)** Citoplasma um plasmatócito (PI) contendo oenocitóides (oe) no seu interior. **B)** Parte de um Adipohemócito com grandes gotas lipídicas (L) no interior de seu citoplasma. **C)** Detalhe do adipohemócito onde se pode observar a presença de inúmeras mitocôndrias (m), perfis de retículo endoplasmático (cabeça da seta) e grande concentração de grânulos de glicogênio (setas). Barras: A e B= 1 $\mu$ m; C=0,5 $\mu$ m.



**Figura 8-** Fotomicrografias eletrônica de transmissão de granulócitos tipo I e II de *R. prolixus*.

**A) Granulócito tipo I** com núcleo (N) irregular e nucléolo (Nu) evidente. O citoplasma é rico em grânulos (setas) de diferentes tamanhos e eletrondensidades, mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (RE) e vacúolos (\*). Foi possível observar a presença de algumas projeções da membrana plasmática (cabeça de seta). **B)** Detalhe do granulócito onde se pode observar grânulo perfis microtubulares (seta) e outro bem eletrondenso (cabeça da seta). **C) Granulócito tipo II** com citoplasma mais denso que o granulócito tipo I, e a presença de vários grânulos irregulares (\*), estes bem justapostos a membrana plasmática, deformando-a (cabeça da seta). Foi possível observar projeções da membrana (seta). **D)**

#### **4. 2 Caracterização morfológica dos hemócitos de *R. prolixus* através da laranja de acridina**

Através da microscopia confocal a laser foi possível caracterizar os diferentes tipos de hemócitos presentes na hemolinfa de *R. prolixus*, de acordo com a emissão de fluorescência de cada célula, bem como identificar presença de compartimentos acídicos, utilizando-se como marcador a laranja de acridina.

Os prohemócitos, quando observados por DIC (contraste interferencial) possuem superfície lisa (Figuras 9-1A). O citoplasma apresentou uma fluorescência homogênea, sendo mais intensa no núcleo (Figuras 9-1B). Nenhuma fluorescência indicativa da presença de compartimentos ácidos foi detectada neste tipo celular (Figuras 9-1D).

Os plasmatócitos apresentam superfície rugosa, e quando observados através da microscopia confocal pudemos observar diferentes padrões de marcação. Na figura 9-2B, a fluorescência está homogeneamente distribuída, sendo mais evidente no núcleo. Na figura 9-3C, no entanto, o nucleoplasma não apresenta marcação e apenas os agregados heterocromáticos apresentam fluorescência.

Ocasionalmente em células altamente espalhadas é possível identificar pequenos compartimentos acídicos dispersos pelo seu citoplasma (Figuras 9-2D e 3D), os quais devem corresponder a lisossomos. Uma concentração destes compartimentos foi observado em um plasmatócito que estava realizando a fagocitose de células (Figura 10) em um inseto não inoculado.

Através do DIC os oenocitóides foram identificados por possuírem superfície bastante homogênea com a presença de alguns compartimentos e o núcleo bastante elíptico (Figuras 9-4A). Uma fraca fluorescência pode ser observada no citoplasma, enquanto que o núcleo se apresenta fortemente marcado pela laranja de acridina (Figuras 9-4B). Vesículas com conteúdo levemente ácido puderam ser evidenciados (Figuras 9-4D).

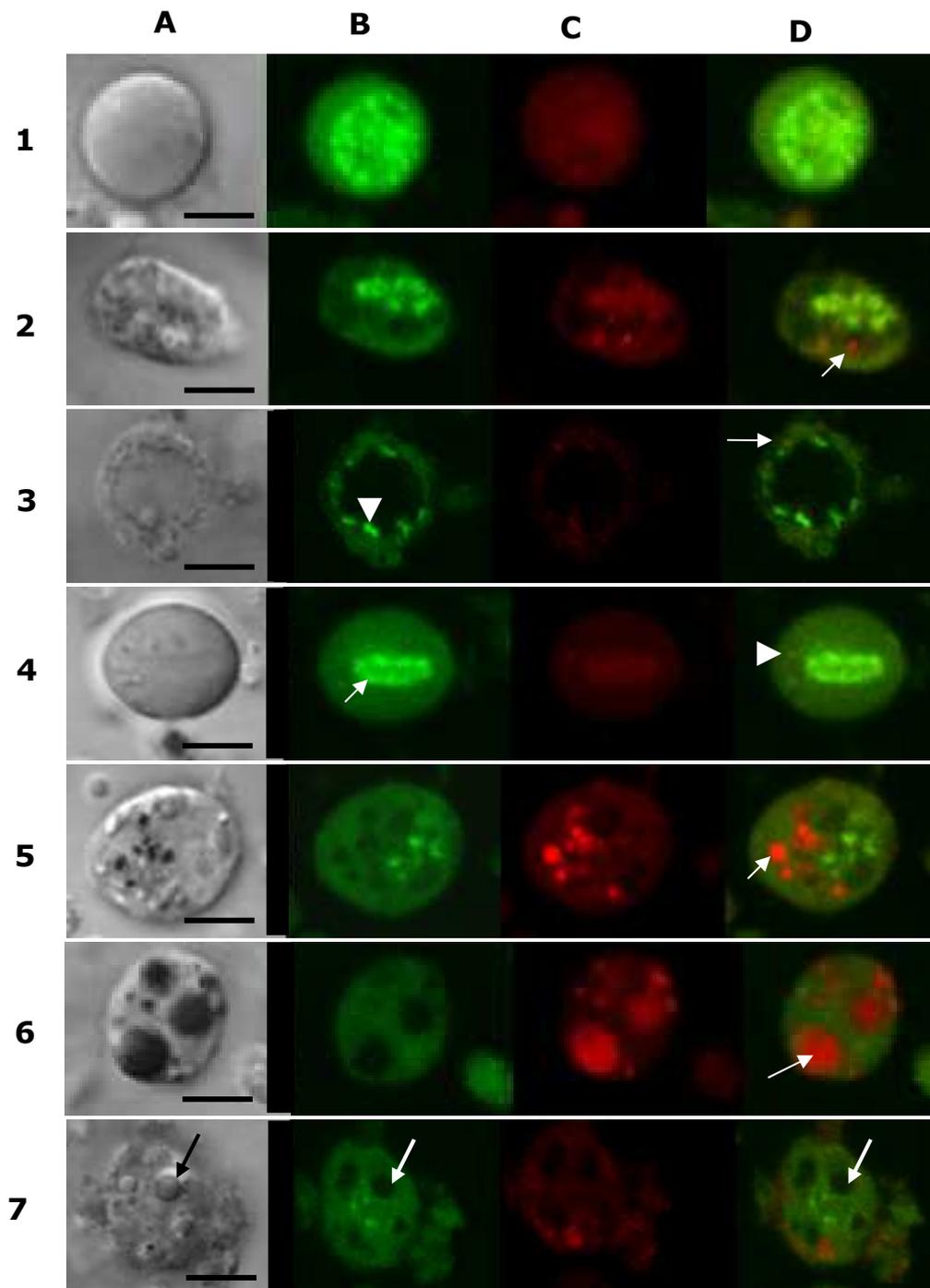
Os granulócitos foram caracterizados como células não aderentes. O tipo I, através do contraste interferencial apresentou grânulos bastante densos e dispersos por todo citoplasma (Figuras 9-5A), alguns destes grânulos apresentaram uma intensa marcação na faixa do laranja, indicando a forte natureza acídica do seu interior (Figuras 9-5C e D), enquanto outros apresentavam uma fraca marcação. Outros ainda não apresentavam marcação para compartimentos ácidos, revelando

---

um caráter básico do seu conteúdo (Figuras 9-5C e D). O granulócito do tipo II apresentou grânulos maiores de formas variadas, todos bastante densos quando observados por DIC e restritos a periferia da célula (Figuras 9-6A). Através da fluorescência, estes grânulos emitiam uma intensa marcação para compartimentos acídicos (Figuras 9-6C e D).

Os adipohemócitos são células frágeis, grandes, com presença de inclusões lipídicas, refringentes quando observadas por DIC em seu citoplasma (Figuras 9-7A), estas inclusões não apresentaram nenhuma marcação para a laranja de acridina, em ambos os canais de detecção (Figuras 9-7B, C e D). Seu citoplasma apresentou uma fraca fluorescência (Figuras 9-7B). Uma fraca marcação em laranja foi observada na periferia, em uma destas células. Todavia, a natureza difusa desta marcação sugere fortemente que seja mais um artefato do que uma marcação específica (figuras 9-7D).

Tendo em vista os plasmatócitos terem apresentado diferentes padrões de marcação, nós adicionamos partículas de látex acopladas a FITC, para verificarmos a fagocitose “in vitro” em tempo real por estas células. Um rápido engolfamento destas partículas foi observado logo após a adição das mesmas ao meio de cultivo, por células que apresentavam as mesmas características das células caracterizadas, através da L.A. como sendo plasmatócitos (Figura 11).

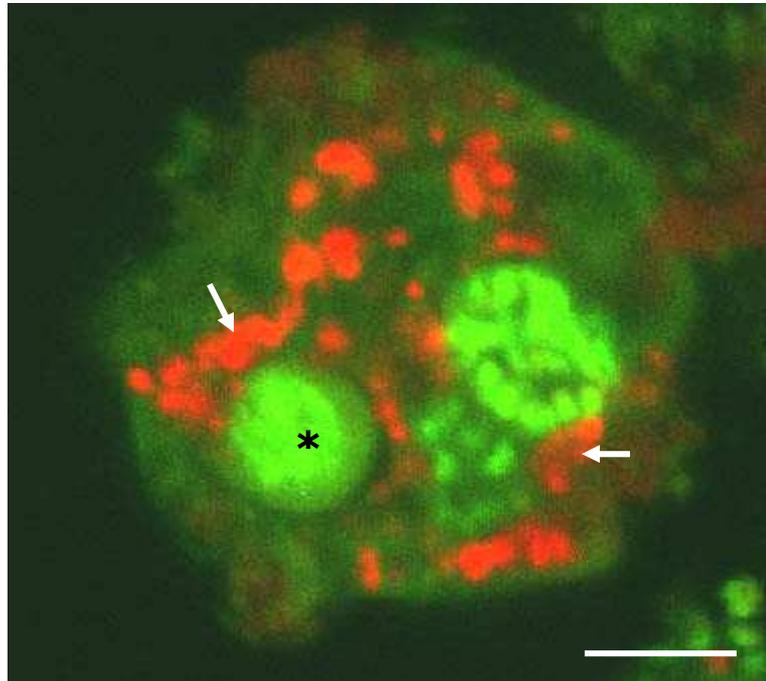


**FIGURA 9-** Morfologia dos hemócitos através do contraste diferencial (coluna A) e confocal a laser (colunas B,C e D), coluna B (510-620 nm; verde), coluna C (550-700 nm; vermelho), coluna D (sobreposição das colunas 2 e 3) dos diferentes tipos de hemócitos de *R. prolixus*

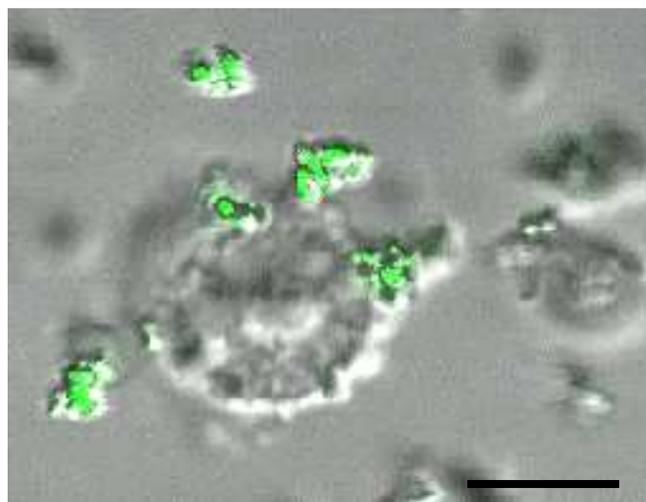
Linha 1- Prohemócito

Linha 2 e 3- Plasmatócito, com diferentes padrões de marcação, presença de compartimento ácido (setas). Heterocromatina (cabeça da seta). Linha 4- Oenocitóide, com o núcleo elíptico (seta) e presença de um compartimento levemente ácido (cabeça da seta). Linha 5- Granulócito I, mostrando um grande número de compartimentos ácidos no citoplasma (seta). Linha 6- Granulócito II, com grânulos grandes, ácidos e periféricos (seta) no citoplasma. Linha 7- Adipohemócito, mostrando inclusões lipídicas, as quais não marcam nem no canal do verde, nem no canal do vermelho (setas).

Barras: 1) 6,58µm; 2) 6,08µm; 3) 4,9µm; 4) 6,34µm; 5) 4,76µm; 6) 6,34µm; 7) 5,0µm.



**Figura 10-** Microscopia confocal a laser de um plasmatócito (pl) de *Rhodnius prolixus* não inoculados, com a presença de outras células em seu interior (\*). Próximo a estas células observa-se uma grande concentração de compartimentos ácido (setas), os quais podem corresponder a lisossomos. Barra: 9,33 $\mu$ m



**Figura 11-** Microscopia óptica de fluorescência e de contraste interferencial de hemócitos de *R. prolixus* inoculados com partículas de látex acopladas a FITC. Observa-se a presença de várias partículas (setas) no interior do plasmatócito.

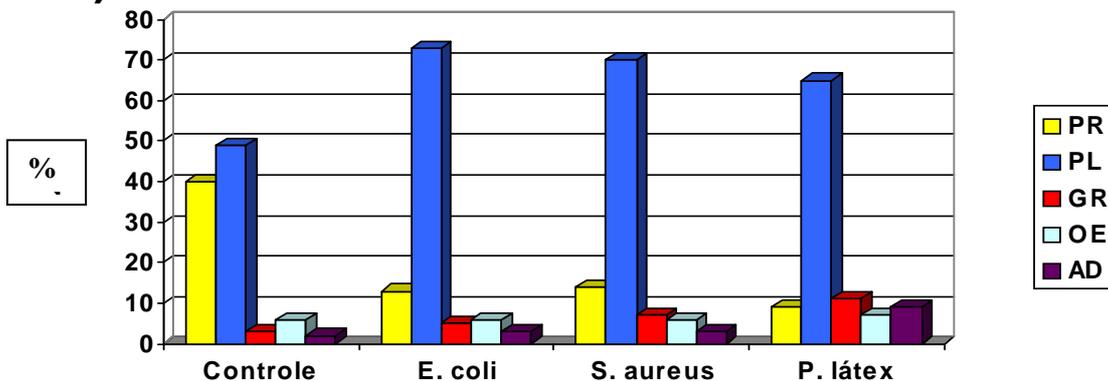
#### **4. 3 Proporção relativa dos diferentes tipos de hemócitos de *R. prolixus*, após inoculação de partículas bióticas ou abióticas**

Com relação à proporção relativa de hemócitos presentes na hemolinfa de *R. prolixus*, verificou-se que ao longo de 120 minutos, estes insetos apresentaram variações na proporção destas células, tanto após a inoculação de partículas abióticas quanto bióticas, quando comparadas ao controle (Gráficos 2). Estas variações já puderam ser observadas com 30 minutos após a inoculação (gráfico 2. A). Independente do estímulo utilizado houve uma drástica redução dos prohemócitos após o desafio. Esta redução foi maior em insetos inoculados com partículas de látex atingindo 9% do total de hemócitos. Por outro lado, os plasmatócitos aumentaram consideravelmente sua porcentagem relativa, sendo o maior aumento observado nos insetos desafiados com partículas bióticas, onde a sua porcentagem alcançou 70% das células encontradas na hemolinfa, comparado com 49% encontrados no controle. Os granulócitos apresentaram um pequeno aumento em sua proporção, principalmente para insetos desafiados com partículas bióticas, com um aumento máximo de 7%, contra os 11% encontrados para este tempo de inoculação. Os oenocitóides mantiveram praticamente a mesma proporção nos três tratamentos, comparando ao controle. Os adipohemócitos tiveram um aumento apenas nos insetos desafiados com partículas de látex, aumento de 2% no controle, para 9% no tratado (Gráfico 2. A).

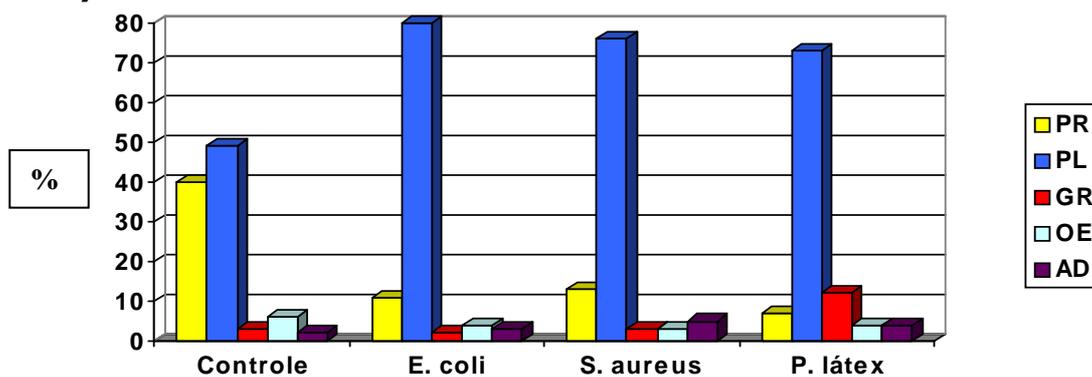
Após 60 minutos de inoculação, pôde se observar às alterações mais significativas nos percentuais dos diferentes tipos celulares da hemolinfa de *R. prolixus*. Os prohemócitos diminuíram ainda mais atingindo uma média de 7% em insetos desafiados com partículas de látex. Insetos inoculados com *E. coli* e *S. aureus* reduziram seus índices para 11% e 13%, respectivamente. Os plasmatócitos atingiram um valor máximo de aumento neste tempo. Enquanto que a porcentagem destas células em insetos controles era de 49%, este índice subiu para 73, 76 e 80% em animais inoculados com partículas de látex, *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Após um aumento dos granulócitos, observado 30 minutos da inoculação, houve uma redução deste índice em insetos desafiados com partículas bióticas, enquanto que para partícula abiótica este índice permaneceu praticamente o mesmo (Gráfico 2.B). Observou-se neste período uma maior diminuição na porcentagem dos oenocitóides e dos adipohemócitos (Gráfico 2. B).

Após 120 minutos após a inoculação as células mantiveram sua proporção estável, com níveis similares ao tempo de 60 minutos após a inoculação (Gráfico 2.C).

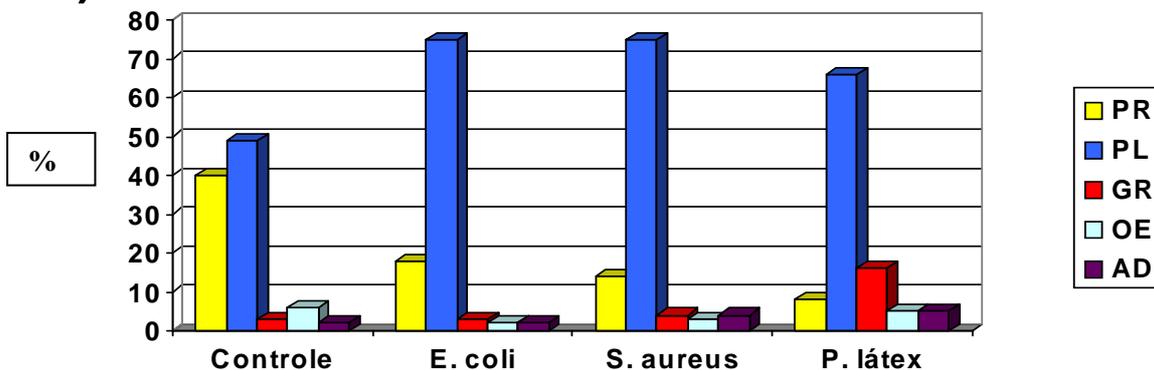
**2. A)**



**2. B)**



**2. C)**



**Gráficos 2** - Porcentagem relativa dos tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa de *R. prolixus*, após inoculação de *E. coli* / *S. aureus* / *P. látex*, **A)** 30 minutos após inoculação; **B)** 60 minutos após inoculação; **C)** 120 minutos após inoculação. PR - prohemócitos; PL - plasmatócitos; GR - granulócitos; OE - oenocitóides; AD - adinhemócitos.

#### **4. 4 Fagocitose de partículas bióticas e abióticas por hemócitos de *R. prolixus***

Durante o processo de interação entre os hemócitos de *R. prolixus* e as partículas bióticas e abióticas, além das diferenças na dinâmica populacional, outros aspectos foram analisados, dentre eles o tipo celular responsável pela fagocitose, o tipo de fagocitose desencadeado por cada tipo de partícula e as alterações morfológicas sofridas pelos hemócitos.

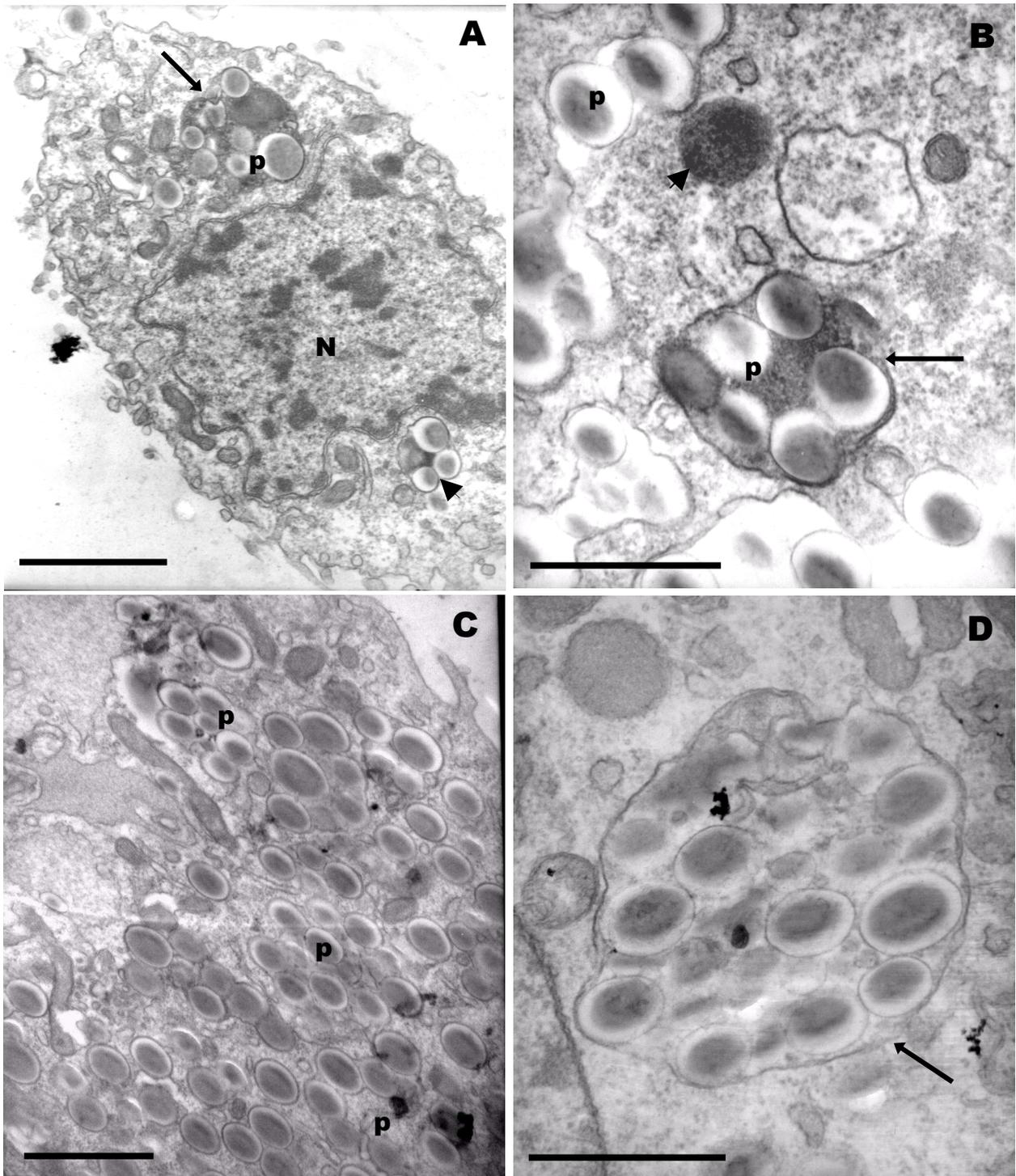
A atividade fagocítica em *R. prolixus*, tanto para partículas bióticas, quanto abióticas foi observada apenas nos plasmatócitos. Contudo o tipo de fagocitose, bem como a intensidade da atividade fagocítica variou para as diferentes partículas empregadas. Além da fagocitose foram observadas melanização e nodulação.

##### **4. 4. 1 Fagocitose de partículas de látex**

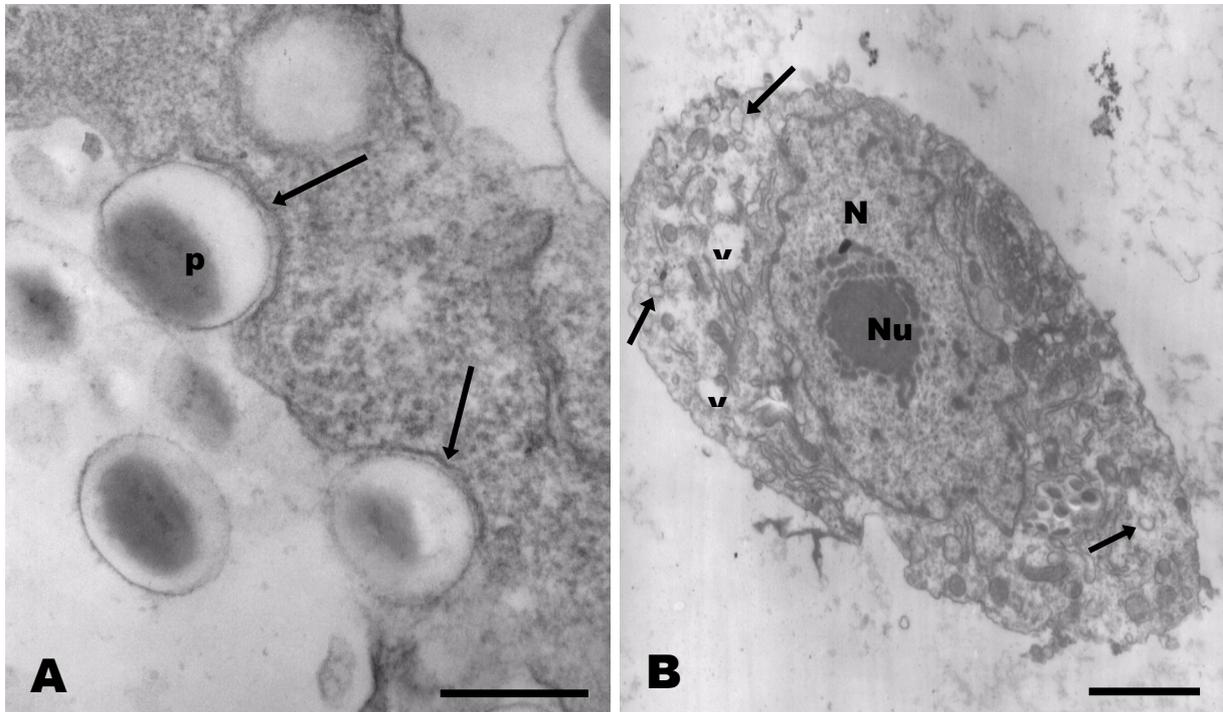
A resposta imune contra partículas de látex já pôde ser observada 30 minutos após inoculação das mesmas e mostrou-se crescente ao longo do tempo em que foi observada. A resposta desencadeada foi a fagocitose, a qual mostrou-se eficaz, quanto a retirada destas partículas da hemolinfa. Após 60 minutos de inoculação, várias partículas de látex foram observadas no interior de plasmatócitos, individualizadas em fagossomas ou reunidas em compartimentos, com matriz eletrondensa, semelhantes a lisossomos (Figuras 12A e B). A atividade fagocítica mostrou-se ainda mais intensa após 120 minutos da inoculação, sendo possível observar inúmeras partículas ingeridas pelos plasmatócitos, ocupando quase na totalidade o citoplasma destas células (Figura 12C). Foi possível notar a presença de mais de dez partículas de látex no interior de um único fagossoma (Figura 12D), demonstrando a grande capacidade fagocítica destes hemócitos para este alvo.

No processo inicial da fagocitose, as partículas de látex parecem afundar na superfície da célula e houve uma associação entre a partícula de látex e a membrana do fagossoma, mostrando-se bem justapostas (Figura 13A), sugerindo desta forma, uma fagocitose do tipo “trigger” contra estas partículas. Nenhum processo de melanização (Figura 13A) ou agregação de hemócitos nos tempos testados foi observado.

A inoculação das partículas de látex na hemolinfa de *R. prolixus*, não provocou grandes alterações morfológicas nos hemócitos. Apenas os plasmatócitos apresentaram uma larga vacuolização no citoplasma, com a presença de diversas vesículas eletrônicas de tamanhos variáveis e um aumento de vacúolos contendo perfis membranosos (Figura 13B).



**Figura 12-** Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de *R. prolixus* desafiados com partículas de látex. **A)** Observa-se o plasmatócito com várias partículas (p) no interior de seu citoplasma, em fagossomas (cabeça da seta) e em compartimentos semelhantes a lisossomos (seta), após 60 minutos da inoculação. **B)** Detalhe das partículas (p) no interior de um fagolisossomo (seta), e presença de um lisossomo próximo a estes fagossomos, com 60 minutos após a inoculação. **C)** Observa-se grande quantidade de partículas (p) no citoplasma do plasmatócito, após 120 minutos de inoculação das mesmas. **D)** Detalhe do plasmatócito, com 120 minutos



**Figura 13-** Fotomicrografia eletrônica de transmissão de hemócitos de *R. prolixus* desafiados com partículas de látex. **A)** Detalhe da formação do fagossoma (setas), durante a fagocitose de partícula de látex (p). Foi possível observar a ausência de melanização sobre estas partículas. **B)** Plasmatócito com intensa vacuolização (v) no citoplasma e com presença de diversas vesículas (setas) eletrólucidas. N- núcleo, Nu- nucleólo. Borges, A. R. 2005, p. 41.

#### 4. 4. 2 Fagocitose de *Escherichia coli* (Gram<sup>-</sup>)

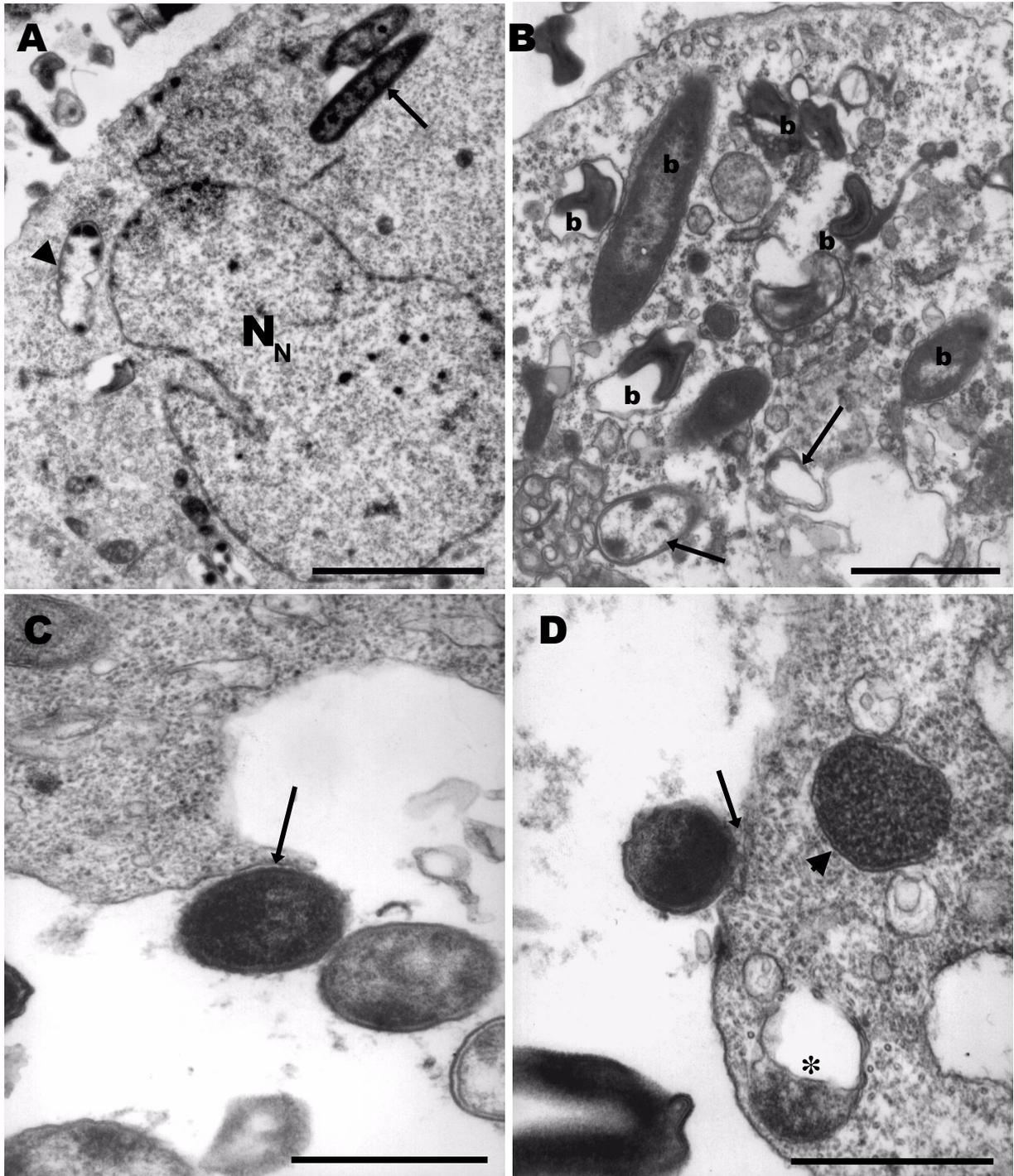
O único mecanismo de resposta imune celular dos hemócitos de *R. prolixus* frente à bactéria Gram<sup>-</sup> *E. coli*, foi a fagocitose. A atividade fagocítica dos plasmatócitos contra *E. coli*, já pôde ser observada após 30 minutos da inoculação. Algumas bactérias já apresentavam, neste período, sinais de degradação (Figura 14A). Após 60 e 120 minutos da inoculação, a fagocitose se mostrou igualmente eficaz, sendo possível observar bactérias individualizadas no interior de fagossomas, algumas intactas, outras completamente degradadas (Figuras 14B e 15C).

Durante o processo inicial da fagocitose foi observada uma íntima relação entre a bactéria e a membrana da célula para a formação do pseudópode (Figuras 14C e D). As bactérias que se encontravam já fagocitadas, estavam completamente aderidas à membrana do fagossoma (Figuras 14D e 15A), sugerindo uma fagocitose do tipo "zipper".

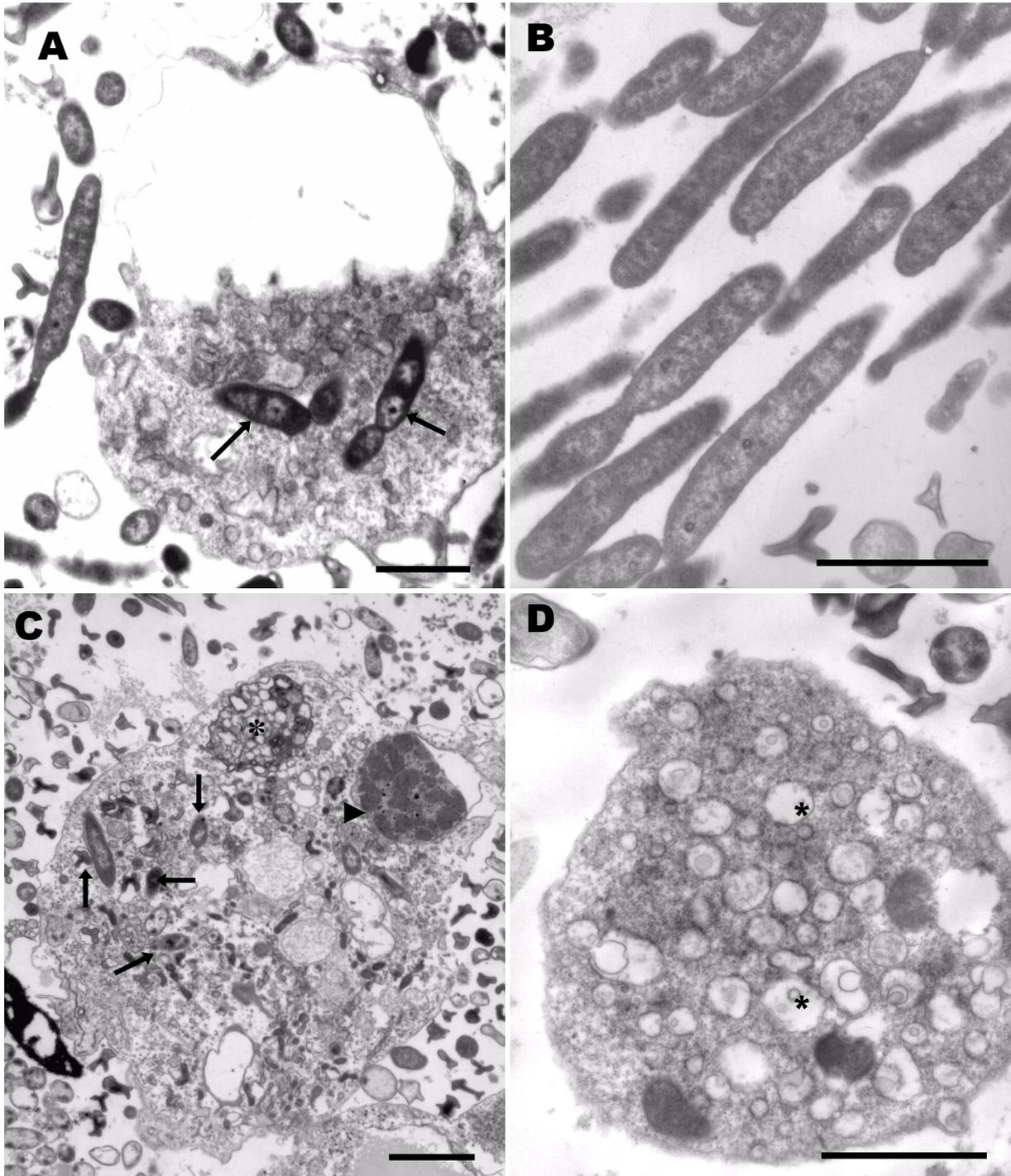
Em todos os tempos analisados, as bactérias não apresentaram nenhum sinal de melanização (Figura 15B), ou de formação de nódulos.

A presença de *E. coli* na hemolinfa de *R. prolixus*, resultou em algumas alterações nos hemócitos, principalmente nos plasmatócitos. Estes apresentaram uma grande vacuolização no citoplasma (Figuras 15D e 16B), as mitocôndrias encontraram-se bastante alongadas, quase sempre rodeadas de microtúbulos, e mais eletrondensas que o normal (Figura 16A). Além do mais, estes plasmatócitos tinham em sua superfície algumas projeções citoplasmáticas (Figura 16B). Um grande número de plasmatócitos rompidos foi observado. Quanto aos oenocitóides, suas vesículas apresentaram-se vazias, com a matriz eletronuscente (Figuras 16C e D). Em algumas delas foi possível observar a sua fusão com a membrana plasmática (Figura 16D).

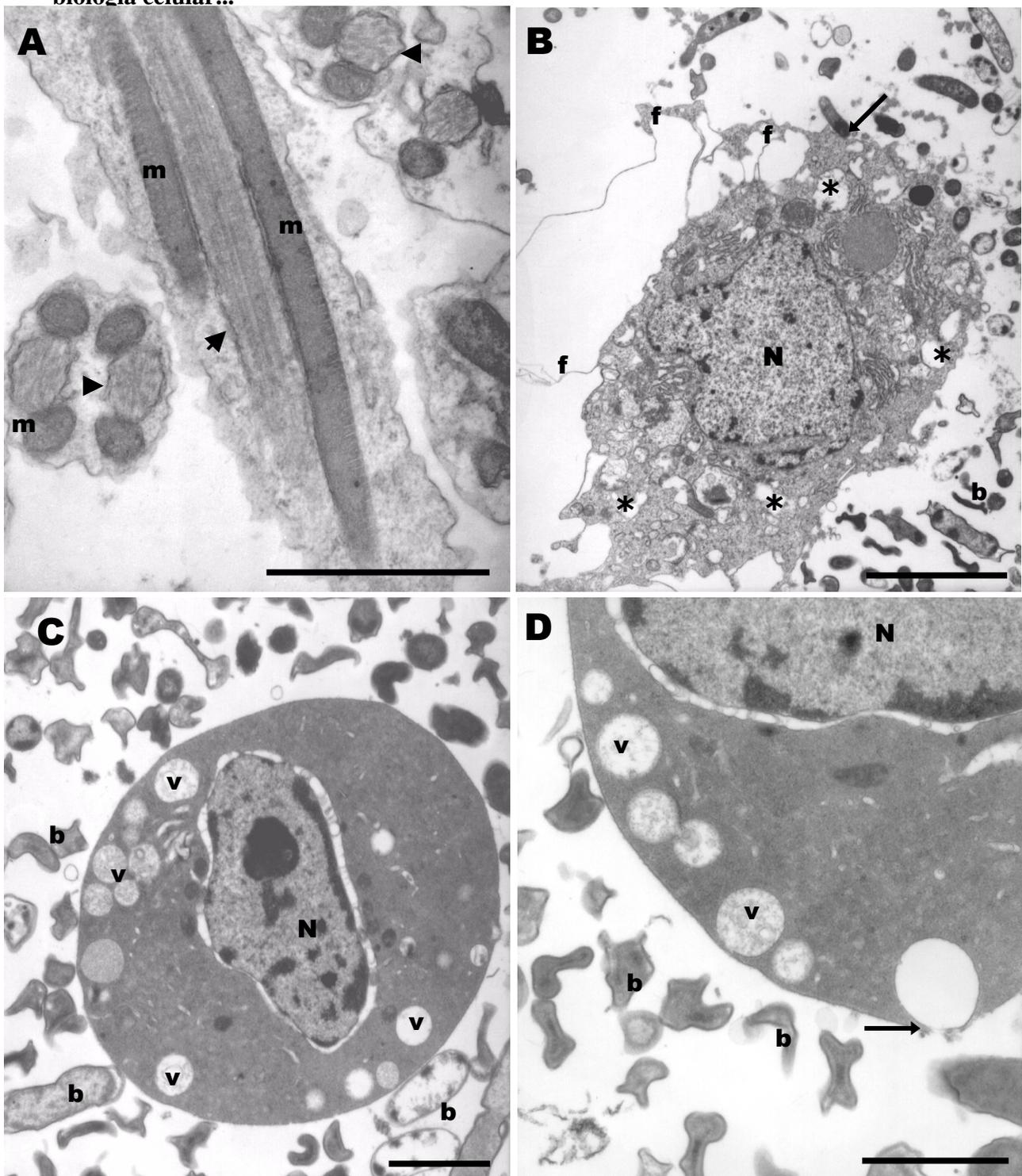
---



**Figura 14-** Fotomicrografia eletrônica de transmissão de hemócitos de *R. prolixus* desafiados com *E. coli*. **A)** Detalhe de um plasmatócito com bactérias em seu interior, umas intactas (seta) e outras já degradadas (Cabeça da seta), após 30 minutos da inoculação. **B)** Parte de um Plasmatócito mostrando a grande quantidade de bactérias (b) em seu interior após 120 minutos de inoculação, algumas já se encontravam degradadas (setas). **C) e D)** Detalhe do início da fagocitose, mostrando a íntima ligação da bactéria com a superfície da célula (Setas) e em D) pode-se também observar esta íntima ligação entre a bactéria fagocitada e o fagossoma (Cabeça da seta), vê-se ainda presença de uma bactéria em degradação (\*). N- Núcleo. Barras: A-2µm; B-1µm; C e



**Figura 15-** Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de *R. prolixus* desafiados com *E. coli*. **A) Plasmatócito** Mostrando a justaposição da membrana do fagossoma e as bactérias fagocitadas (setas) com 60 minutos da inoculação. **B)** Bactérias *E. coli* no meio extracelular mostrando que não há qualquer deposição de material sobre elas. **C) Plasmatócito** bastante alterado morfológicamente e com grande quantidade de bactérias fagocitadas (setas). Observa-se um peculiar arranjo de mitocôndrias (Cabeça da seta) e uma grande quantidade de vacúolos (\*). **D)** Plasmatócito com uma grande vacuolização no citoplasma (\*). Barras: A, B e D=1 $\mu$ m;



**Figura 16-** Fotomicrografia eletrônica de transmissão de hemócitos de *R. prolixus* desafiados com *E. coli*. **A)** Detalhe das mitocôndrias (m) do plasmatócito, mostrando as alterações sofridas por elas, como alongamento, mais eletrondensa e associada a microtúbulos (cabeça da seta). **B)** Plasmatócito mostrando grandes alterações morfológicas, após 60 minutos da inoculação, como uma grande vasculização no citoplasma (\*), presença de extensões da membrana plasmática (f) e pode-se observar ainda a ligação entre uma bactéria e a superfície da célula (seta). **C)** Oenocitóide com várias vesículas eletronluscetes (v) em seu citoplasma **D)** Detalhe do oenocitóide com suas vesículas eletronluscetes (v) e uma delas rompida para o meio extracelular (seta). N - Núcleo, bactérias no meio extracelular (b). Barras. A=2µm, B, C e D=1µm.

#### 4. 4. 3 Fagocitose de *Staphylococcus aureus* (Gram <sup>+</sup>)

A resposta imune celular contra *S. aureus* mostrou-se bastante variada, sendo possível observar três mecanismos distintos: fagocitose, melanização e nodulação.

Após 30 minutos de inoculação observou-se a presença de bactérias no interior de fagossomas de plasmatócitos. Em algumas destas células, as bactérias fagocitadas se encontravam em processo de degradação (Figura 17A). Apesar dos hemócitos apresentarem atividade fagocítica, esta foi considerada baixa com apenas duas bactérias em média encontradas no interior de cada plasmatócito. Bactérias individualizadas podiam ser encontradas em um único fagossoma (Figura 9B) ou em fagossomas diferentes (Figura 17C). Nem todos os plasmatócitos apresentaram atividade fagocítica.

O tipo de fagocitose contra estas bactérias foi semelhante a fagocitose do tipo "zipper", caracterizada pela formação de pseudópodes e pela justaposição da membrana da bactéria e a membrana do fagossoma (Figura 17C).

Entre 60 e 120 minutos após a inoculação de *S. aureus*, observou-se a formação de agregados de hemócitos (Figuras 18 B e C). A análise dos nódulos através da MET mostrou a presença de granulócitos do tipo I e de plasmatócitos. Estes últimos apresentavam quase sempre atividade fagocítica (Figura 18C). Às vezes finas projeções do citoplasma dos plasmatócitos foram observadas envolvendo completamente os granulócitos (Figura 18C). 120 minutos após a inoculação, bactérias em processo de degradação no interior dos plasmatócitos puderam ser observadas (Figura 18C).

Eventualmente, oenocitóides apareceram próximos aos microagregados (dados não mostrados).

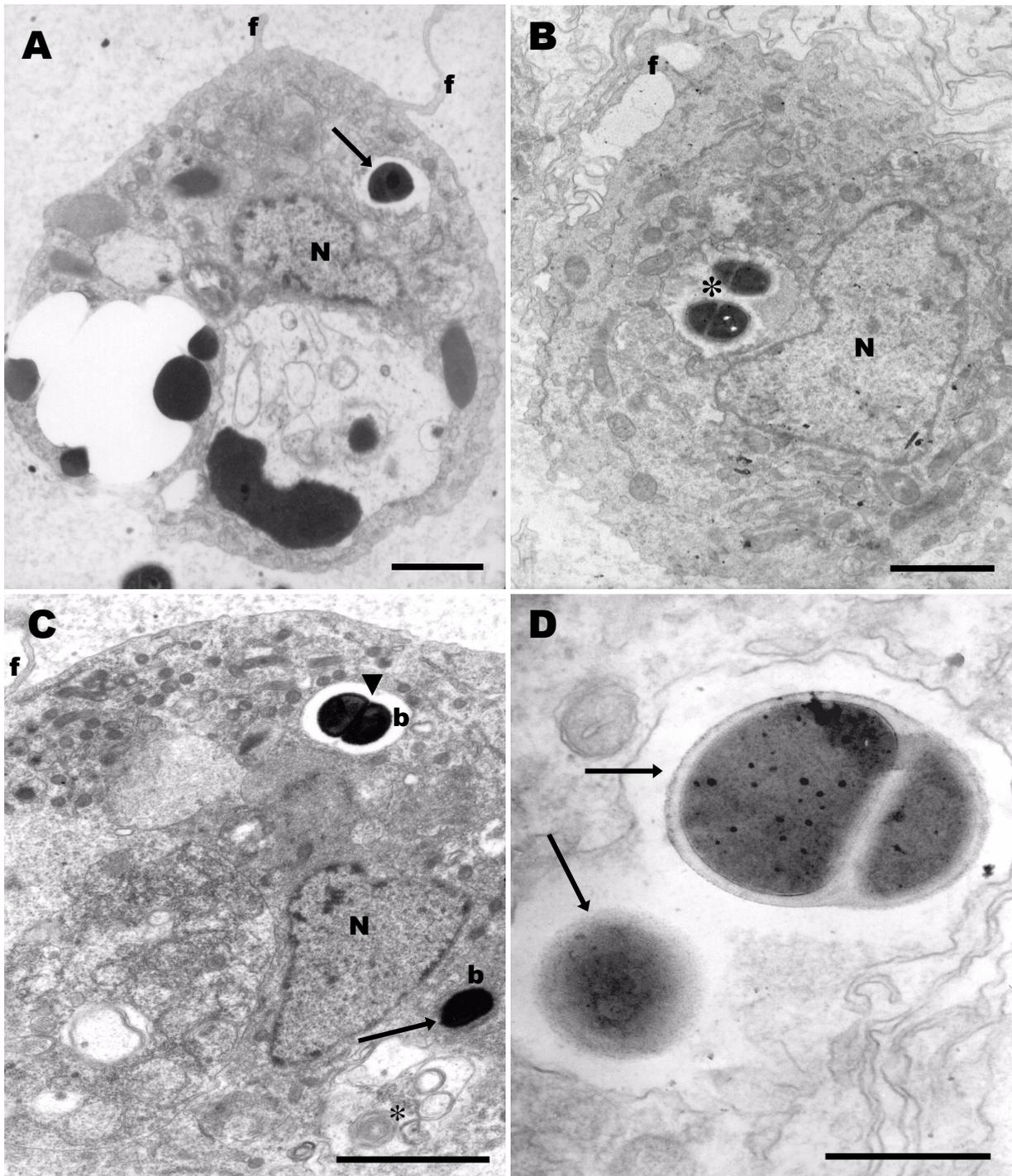
Intenso processo de deposição de material granular, indicativo do processo de melanização foi observado sobre as bactérias extracelulares (Figura 18A), enquanto que bactérias que se encontravam no interior dos plasmatócitos não apresentaram nenhum sinal de melanização (Figura 17D).

Drásticas alterações morfológicas foram identificadas em alguns hemócitos ativados após a inoculação de *S. aureus*. Os plasmatócitos apresentaram um núcleo

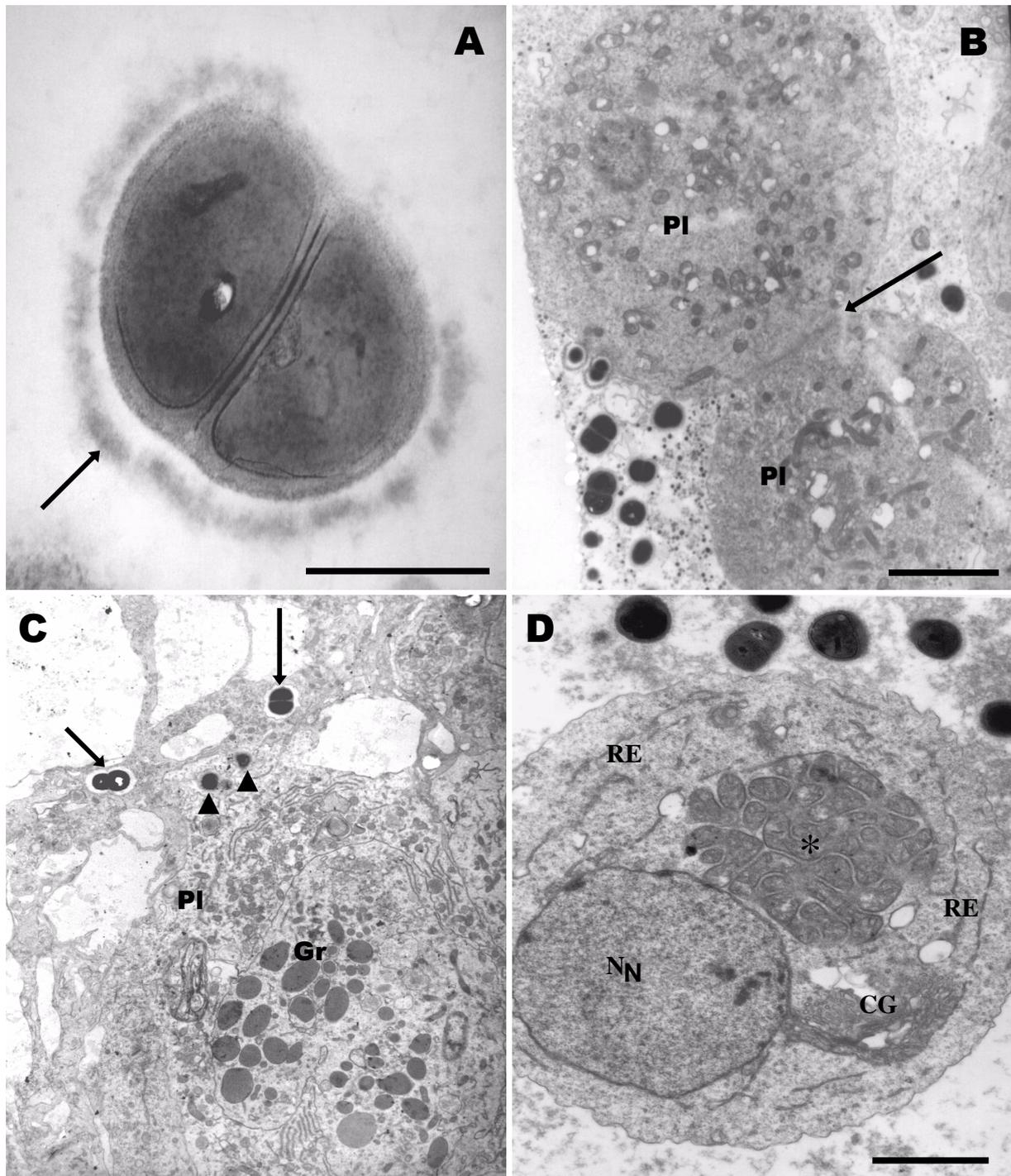
---

com aspecto eucromático, com o nucleoplasma granular, citoplasma pouco eletrondenso com uma complexa organização de mitocôndrias em forma de círculos, concentradas em um dos pólos da célula. Houve também um aumento no número de retículo endoplasmático (Figura 18D). Os oenocitóides apresentaram grande quantidade de vesículas eletronalucidas e outras com diferentes quantidades de material no seu interior (Figura 19B). Os adipohemócitos ativados apresentaram grandes alterações morfológicas, com um aumento aparente no número de mitocôndrias, as quais mostraram-se mais alongadas e mais eletrondensas (Figura 19A), um aumento no número de perfis de retículo endoplasmático e vacúolos, ausência das inclusões lipídicas, e uma redução no número de grânulos de glicogênio também foram observados (Figura 19A).

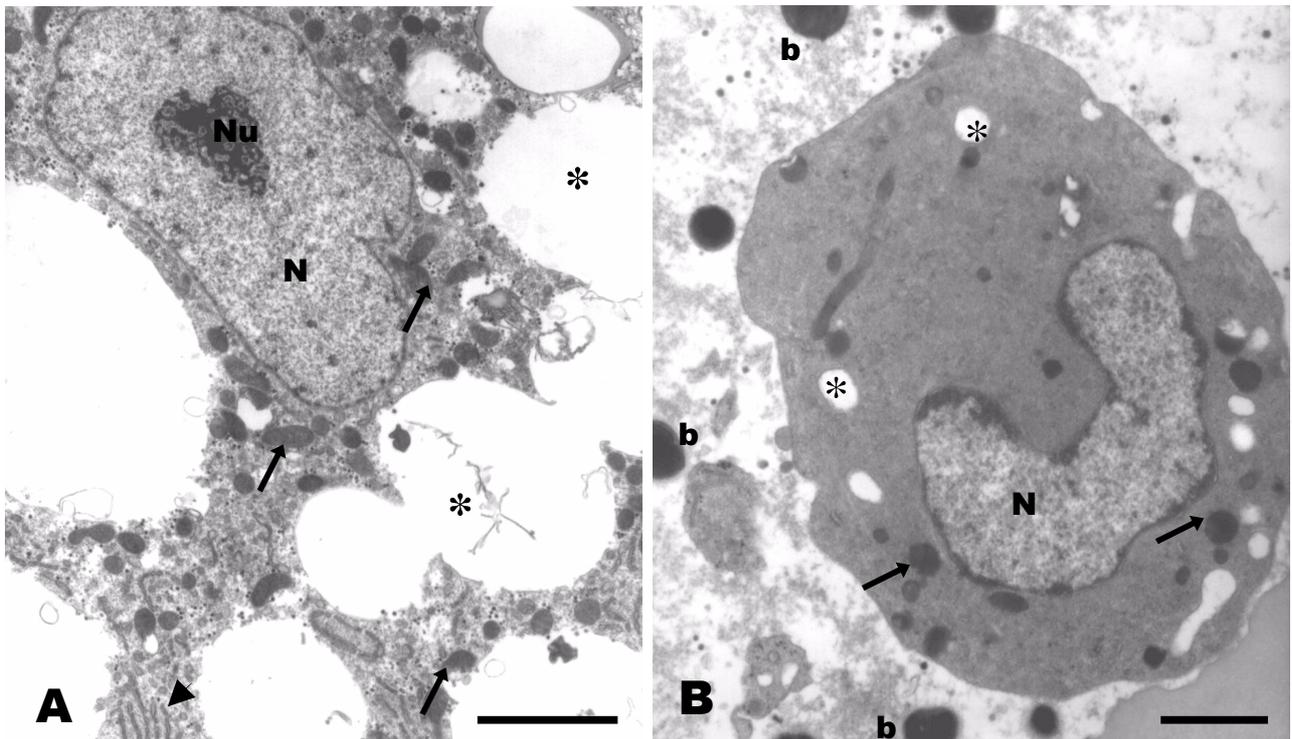
---



**Figura 17-** Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de *R. prolixus* desafiados com *S. aureus*, após 30' da inoculação. **A)** Observa-se plasmatócito com uma bactéria em processo de degradação (seta). **B)** Duas bactérias presentes no mesmo fagossoma (\*). **C)** Duas bactérias (b) em fagossomas distintos, em um podemos observar a sua íntima relação com a bactéria (seta), no outro está bactéria encontra-se frouxa neste fagossoma (cabeça de seta). Observa-se a presença de figuras de mielina (\*). **D)** Detalhe do fagossoma, com bactérias completamente soltas (setas), sem haver



**Figura 18-** Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de *R. prolixus* desafiados com *S. aureus*. **A)** Detalhe de uma bactéria no meio extracelular, onde se observa nitidamente deposição de material sobre ela (seta), caracterizando uma melanização. **B)** Observa-se agregação celular (seta) por parte dos plasmatócitos (PI), ao redor das bactérias, com 60 minutos após a inoculação das mesmas. **C)** Estágio mais avançado da nodulação, com 120 minutos após a inoculação, é possível observar a participação de plasmatócitos (PI) e granulócitos (Gr), e presença de bactérias no interior dos plasmatócitos (setas), algumas já em processo de degradação (cabeça da seta). **D)** Plasmatócito apresentando drásticas alterações morfológicas, observa-se o núcleo (N) com aspecto eucromático, o citoplasma com um arranjo de mitocôndrias em forma de círculo (\*) e presença de retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi (CG). Barras: A=0,25 $\mu$ m; B=2 $\mu$ m; C= ; D=1 $\mu$ m.



**Figura 19-** Fotomicrografias eletrônica de transmissão de hemócitos de *R. prolixus* desafiados com *S. aureus*. **A) Adipohemócito** mostrando um grande número de mitocôndrias eletrondensas (setas), retículo endoplasmático (cabeça da seta) e inclusões lipídicas vazias (\*). Foi possível observar também a diminuição dos grânulos de glicogênio. **B) Oenocitóide** com vesículas de diferentes eletronsensidades (setas) e algumas inclusões lipídicas (\*). Adaptado de Borges, A. R. e Costa, D. (1998).



Análise através da microscopia eletrônica de transmissão permitiu a identificação, em nosso estudo de 6 tipos celulares distintos: prohemócitos, plasmatócitos, oenocitóides, granulócitos tipo I e II e adipohemócitos. Tais resultados estão parcialmente de acordo com Oliveira e De Souza (2003), diferindo apenas na distinção feita em nosso estudo entre dois tipos de granulócitos, granulócito tipo I e granulócito tipo II.

No presente estudo nós identificamos os prohemócitos como sendo células que possuem uma grande relação núcleo citoplasma, além de serem pobres em organelas. Tais características são idênticas às descritas em estudos anteriores com hemócitos de várias espécies de insetos (COSTA *et al.*, 2005; HILLYER; CHRISTENSEN, 2002; BRAYNER *et al.*, 2004) e também em triatomíneos (AZAMBUJA *et al.*, 1991; OLIVEIRA; DE SOUZA, 2003).

Dois tipos celulares de granulócitos puderam ser observados no presente trabalho, granulócito tipo I e tipo II, os quais diferem quanto a forma, localização e tamanho de seus grânulos, bem como a densidade do citoplasma. O primeiro apresenta inúmeros grânulos com eletrondensidades variável distribuídos aleatoriamente por todo citoplasma. Alguns destes, apresentavam estruturas semelhantes a microtúbulos, embora estes apresentem espessura menor do que a esperada para esta estrutura. Este tipo de grânulo estruturado também foi encontrado em plasmatócitos corroborando a hipótese levantada por alguns autores de que tanto os granulócitos quanto os plasmatócitos possam derivar de uma mesma linhagem celular (LING *et al.*, 2005). Os grânulos do granulócito do tipo II são grandes e estão localizados bem próximos à membrana plasmática, deformando a superfície celular, muito destes apresentando estrutura paracristalina. Embora hemócitos com características semelhantes a descritas para os granulócitos do tipo II, encontrado em nosso estudo, terem sido descritos em outros invertebrados como esferulócitos (BARRACO *et al.*, 1989), nós optamos por considerá-lo como um subtipo de granulócito, visto que não se pode ainda descartar a hipótese de que estas células possam representar um estágio mais maduro do granulócito do tipo I. A proximidade dos grânulos com a superfície celular reforça a idéia de que este tipo celular descarrega seus grânulos no meio extracelular, em resposta a estímulos externos ainda não conhecidos.

---

Os oenocitóides apesar de se apresentarem como um grupo de células com características morfológicas individuais (HYPISA; GRUBHOFFER, 1997), alguns autores classificam-no como outro tipo celular. Barracco e Loch (1989) através de uma análise por microscopia eletrônica de transmissão classificaram este tipo celular como coagulócito, baseados na presença de um espaço perinuclear, o que na verdade pode ser decorrente da metodologia empregada por estes autores. Através de uma análise ultraestrutural nós observamos células com as mesmas características descritas por vários autores, com a ausência destes espaços perionucleares, as quais chamamos de oenocitóides (WIGGLESWORTH, 1979; HYPISA; GRUBHOFFER, 1997; OLIVEIRA; DE SOUZA, 2003).

Os adipohemócitos são células facilmente identificadas, através da microscopia óptica convencional, por apresentarem grandes e numerosas inclusões lipídicas. Análise ultraestrutural destas células permite inferir o seu papel na reserva de energia.

Os plasmatócitos são as células mais polimórficas encontradas na hemolinfa de *R. prolixus* e às vezes podem ser confundidas tanto com prohemócitos quanto com granulócitos tanto na microscopia óptica convencional quanto através da microscopia eletrônica de transmissão. Estudos sobre a ontogenia dos hemócitos em diversos grupos de invertebrados têm tentado explicar estas controvérsias pelo fato destas células serem originárias de uma mesma linhagem, que ao longo do seu desenvolvimento vão se especializando em tipos morfológicos e funcionais distintos (LING *et al.*, 2005).

Apesar das nossas análises através de microscopia eletrônica terem permitido uma discriminação morfológica dos diferentes tipos celulares presentes na hemolinfa, este tipo de abordagem leva muito tempo. Além do mais nos estudos sobre dinâmica hemocitária, onde uma classificação através da microscopia óptica se faz necessária, este tipo de abordagem é pouco útil. A utilização em geral de células fixadas e coradas na microscopia óptica pode gerar interpretações equivocadas.

A laranja de acridina (L.A.) é uma base fraca, fluorescente, permeável às membranas celulares, que se concentra em compartimentos acídicos mudando o seu espectro de emissão da faixa de 510-600 nm (verde) para a faixa 550-700 nm (vermelho). Uma outra característica da laranja de acridina é a sua propriedade de se

---

ligar ao DNA e RNA, permitindo a marcação tanto do núcleo quanto do citoplasma celular. O uso da laranja de acridina é um eficiente método para o estudo de apoptose e necrose celular (CAÑETE *et al.*, 2001; FOGLIENI *et al.*, 2001). Recentemente esta técnica tem sido utilizada com sucesso na marcação, “in vitro”, dos diferentes tipos de hemócitos do Lepidóptero *Bombyx mori* (LING *et al.*, 2003). Apesar de terem sido capazes de discriminar os diferentes tipos de hemócitos, estes trabalhos não exploraram as propriedades da laranja de acridina na identificação de compartimentos ácidos, o que poderia melhor categorizar estes diferentes tipos celulares. Em nosso trabalho, nós também utilizamos a L.A. tanto para identificação de compartimentos básicos quanto ácidos. Nossos resultados mostraram que os diferentes tipos celulares identificados através da microscopia eletrônica puderam ser igualmente observados através da microscopia confocal a laser. Quando marcados com L.A. os prohemócitos podem ser facilmente distinguidos dos outros tipos celulares por apresentarem uma marcação bastante homogênea tanto no citoplasma quanto no núcleo e não possuem compartimentos acídicos. Por outro lado, os plasmatócitos, e os granulócitos I e II apresentaram compartimentos ácidos em seu citoplasma, os quais diferem-se no tamanho, quantidade e intensidade da marcação. Tendo em vista que os plasmatócitos são as únicas células fagocíticas encontradas em *R. prolixus* é possível que estes compartimentos possam corresponder a lisossomos. De fato, Oliveira e De Souza (2003) observaram que em plasmatócitos infectados por *T. rangeli* o número de compartimentos ácidos aumenta, inferindo que estes podem corresponder a lisossomos necessários na digestão de material fagocitado. Nós também observamos um grande número de compartimentos ácidos em um plasmatócito que aparentemente estava realizando a fagocitose de células, reforçando assim esta idéia. Tendo em vista que a localização dos compartimentos acídicos nos granulócitos é possível que estes correspondam aos grânulos observados através da microscopia eletrônica de transmissão. Todavia, a natureza dos componentes presentes nestes grânulos responsável pelo seu caráter ácido precisa ser melhor investigado. As diferentes intensidades de fluorescência encontradas nestes compartimentos sugerem que estes apresentam diferentes graus de maturação.

---

Os oenocitóides apresentam uma marcação no canal verde bastante semelhante ao observado nos prohemócitos. Todavia, uma melhor observação permite uma fácil separação entre estes tipos celulares. Enquanto nos prohemócitos o núcleo aparece homoganeamente marcado, nos oenocitóides a marcação se restringe a periferia desta organela. Aliado a isto podemos evidenciar a presença de grânulos com conteúdo levemente ácido nestas células. Nossos resultados não estão de acordo com os obtidos por Ling *et al.* (2003) os quais não observaram marcação nem no núcleo e nem no citoplasma dos oenocitóides de *Bombyx mori*, quando estes foram tratados com a laranja de acridina. Interessantemente estes autores, utilizando o iodeto de propídio, encontraram uma forte marcação do núcleo dos oenocitóides. As diferenças encontradas entre perfil de marcação para L.A. encontrada em nosso estudo e os observado por estes autores, sugerem que a utilização da L.A. como marcador específico geral de hemócitos deve ser feita com precaução e que o padrão de marcação encontrado para um tipo celular em uma espécie pode não se aplicar a outra.

Tendo em vista que os hemócitos participam ativamente da resposta imune dos insetos nós analisamos o perfil populacional destas células durante os estágios iniciais da resposta a desafios imunológicos. Com relação aos tipos celulares presentes em insetos desafiados tanto por bactérias quanto por partículas abióticas, observamos o aumento de alguns tipos celulares e diminuição de outros. Tais variações devem estar relacionadas a uma efetiva resposta imune celular do inseto frente a estas partículas. Os prohemócitos tiveram uma considerada diminuição na sua porcentagem relativa em todas as situações em que os insetos foram desafiados. Esta diminuição nos níveis de prohemócitos foi acompanhada por um aumento na porcentagem relativa dos plasmatócitos. Estudos prévios demonstraram que os prohemócitos estão localizados nos órgãos hematopoiéticos e também estão presentes na circulação dos insetos, sendo considerados por muitos autores como células tronco das quais derivam os demais tipos celulares (GUPTA; SUTHERLAND, 1967, YAMASHITA; IWABUCHI, 2001; LING *et al.*, 2005). Assim o decréscimo, dos prohemócitos e o aumento dos plasmatócitos observados em animais desafiados poderiam ser resultado da diferenciação dos prohemócitos em plasmatócitos. De fato, estudos realizados por

---

Yamashida e Iwabuchi (2001) demonstraram que prohemócitos *Bombyx mori* em cultura, são capazes de se diferenciar tanto em plasmatócitos quanto granulócitos.

Embora vários autores tenham observado uma redução no número de granulócitos após infecção (DA SILVA *et al.*, 2000; OLIVEIRA; DE SOUZA, 2003), nossos resultados mostraram que estas células apresentam um discreto aumento quando comparadas com insetos controles, sendo este aumento mais pronunciado em animais desafiados imunologicamente com partícula de látex. Os granulócitos são células encontradas normalmente associadas aos processos de formação de nódulos e de fagocitose (LAVINE; STRAND, 2002). Tendo em vista que não houve formação de microagregados nem ingestão de partículas por estas células, o papel destas células na ingestão de partículas abióticas ainda precisa ser melhor elucidado. Resultado semelhante, com relação ao aumento da porcentagem dos granulócitos foi observado por Brayner *et al.* (2006) estudando variações na população de hemócitos durante a resposta imune de *Culex quinquefasciatus* contra *Wuchereria bancrofti*.

Os oenocitóides mantiveram praticamente a mesma proporção entre os diferentes tempos e ensaios utilizados quando comparados com o controle. Nossos resultados estão de acordo com Da Silva *et al.* (2000), estes autores não observaram diferenças significativas na proporção destes oenocitóides de *Culex quinquefasciatus* desafiados com *Candida albicans*. Tendo em vista, as alterações sofridas por estas células e o processo de melanização encontrado na resposta celular frente ao desafio com bactérias, a manutenção de níveis destas células mais ou menos constante pode parecer paradoxal. Contribuindo para esta controvérsia, Oliveira e De Souza (2003) demonstraram que há um aumento significativo destes oenocitóides em resposta ao desafio com *T. rangeli*. É possível que as taxas destes hemócitos sejam mantidas por uma reposição das mesmas a partir de centros de hematopoiese ou por diferenciação a partir de uma linhagem celular precursora. Em nosso estudo, a proporção de adipohemócitos foi relativamente baixa quando comparada com os demais tipos celulares tanto em hemócitos tratados como controles. Tais resultados estão de acordo com Silva *et al.* (2000) os quais acreditam que o método usado para fixação, dissolve os lipídios causando ruptura destas células, as quais são extremamente frágeis (HILLYER *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2005). Por outro lado, Barraco *et al.* (1987),

---

levantam a hipótese de que os adipohemócitos não são células circulantes da hemolinfa e sim façam parte do corpo gorduroso de onde eventualmente se desprendem caindo na hemolinfa, o que explicaria a sua baixa proporção na hemolinfa destes insetos.

Sabe-se que os insetos possuem um eficiente e complexo mecanismo de defesa contra patógenos (HERNADEZ *et al.*, 1999; GILLESPIE *et al.*, 1997) e o conhecimento da resposta imune montada contra estes patógenos é crucial para se estabelecer novas estratégias de controle. Apesar da importância dos estudos nesta área, pouco se sabe sobre a resposta imune em triatomíneos. Como parte desta resposta, a fagocitose não é apenas um mecanismo de defesa contra microorganismos, mas também está envolvida no desenvolvimento embrionário e nos processos de eliminação de células apoptóticas ou senescentes da circulação (SWANSON; BAER, 1995). Estudos prévios em *R. prolixus* demonstraram que plasmatócitos são capazes de ingerir formas epimastigotas de *T. rangeli*, os quais são encontrados no interior de vacúolos parasitóforos, sendo posteriormente digeridos (AZAMBUJA *et al.*, 2005; OLIVEIRA; DE SOUZA, 2003). Curiosamente, apesar dos plasmatócitos serem capazes de destruir o *T. rangeli*, o parasita de alguma forma consegue se manter na hemolinfa do inseto, apontando para necessidade de um melhor aprofundamento destes estudos, no sentido de elucidar os mecanismos responsáveis pela manutenção do ciclo do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado. No presente estudo, nós também demonstramos que os plasmatócitos são os únicos tipos celulares capazes de realizar fagocitose, tanto para partículas abióticas (partículas de látex), como para partículas bióticas, tais como bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*). Resultados semelhantes foram encontrados em *Drosophila melanogaster* onde foi demonstrado que apenas os plasmatócitos estão envolvidos na fagocitose (MEISTER; LAGUEUX, 2000). Por outro lado, GIULIANINI *et al.*, (2003) demonstraram que os oenocitóides e granulócitos são as células responsáveis pela fagocitose de partículas de látex em *Cetonischema aeruginosa*. Em *Manduca sexta*, hemócitos hiperfagocíticos participaram ativamente da fagocitose, com um grande número de bactérias em seu interior, sendo também responsáveis pelos estágios iniciais da nodulação (DEAN *et al.*, 2004). Tais resultados demonstram que os tipos de hemócitos envolvidos na resposta

---

imune de insetos variam entre os grupos provavelmente como resultado de pressões seletivas distintas.

De maneira geral o mecanismo fagocítico elicitado em resposta ao desafio imunológico depende não só do tipo de partícula a ser interiorizada como também das características inerentes as moléculas presentes na superfície da célula fagocítica. Nos insetos, a resposta imune inclui um grupo de receptores de reconhecimento padrões que se ligam a padrões moleculares existentes na superfície de microrganismos tais como lipopolissacarídeos (presente na superfície de bactérias Gram- negativas) e  $\beta$ -1.3.glucan (encontrado na superfície de fungos) (UNDERHILL; OZINSKY, 2002; OHTA *et al.*, 2006). Apesar da natureza destas moléculas em *R. prolixus* ainda é desconhecida, é provável que a fagocitose de bactérias por este inseto possa ocorrer por mecanismos de reconhecimento similares, visto que a resposta imune é altamente conservada. Por outro lado, é óbvio que partículas abióticas como látex e agarose não possuem nenhuma molécula padrão de superfície capaz de ser reconhecida por receptores específicos na superfície do fagócito. Assim, nós acreditamos que proteínas presentes na hemolinfa se adsorvam as partículas funcionando como opsoninas facilitando a eliminação destas partículas da hemolinfa. De fato, Fryer e Bayner (1996) demonstraram que proteínas presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* eram encontradas adsorvidas a superfície de partículas de látex facilitando a sua fagocitose pelos hemócitos.

Nossos resultados demonstraram que o mecanismo de interiorização elicitado diferiu entre os alvos analisados. Enquanto a fagocitose de bactérias parece envolver um contato íntimo entre a membrana da bactéria e a membrana do plasmatócito, caracterizando uma fagocitose do tipo “zipper”, a fagocitose das partículas de látex parece ser a do tipo “trigger”, onde nenhuma projeção da membrana é observada e o alvo a ser fagocitado parece afundar na célula, podendo dar origem a um fagossoma mais ou menos aderente. Apesar de não termos verificado a presença de bactérias sendo interiorizadas através de macropinocitose, a existência de inúmeras projeções semelhante a filopódios puderam ser visualizados em plasmatócitos contendo partículas fagocitadas, sugerindo que este processo também possa ocorrer.

---

Enquanto a fagocitose foi a única resposta celular observada contra *E. coli* e partículas de látex, a formação de microagregados e melanização foram observados durante a infecção dos insetos com *S. aureus*. Estudos morfológicos e citoquímicos prévios sobre resposta imune de *Aedes aegypti*, *Aedes subalbatus* e *Anopheles albimanus* demonstraram que algumas bactérias Gram-positivas são primariamente melanizadas, enquanto que bactérias Gram-negativas são apenas fagocitadas (HILLYER *et al.*, 2003; HERNANDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2002). Resultados semelhantes foram obtidos por nós quando analisamos a fagocitose de *S. aureus* e *E. coli*, por plasmatócitos. Diferentemente do reportado em outros estudos (DA SILVA *et al.*, 2000; OLIVEIRA; DE SOUZA, 2003), as respostas de microagregação e melanização puderam ser observadas nas etapas iniciais da resposta celular contra esta bactéria. Além disso, nós não identificamos a presença de bactérias melanizadas no interior de plasmatócitos. Assim, a hipótese que a formação de nódulos é um processo secundário quando a fagocitose parece não dar conta da infecção (DA SILVA *et al.*, 2000), parece não se aplicar ao *R. prolixus*. Neste caso, é provável que nos primeiros momentos da infecção poucas bactérias sejam fagocitadas por plasmatócitos via fagocitose do tipo “zipper”, enquanto um eficiente processo de formação de agregados e melanização esteja simultaneamente ocorrendo na hemolinfa. Como estabelecido por outros autores (WIEGAND *et al.*, 2000; GUPTA, 1986; GILLESPIE *et al.*, 1997), nossos resultados demonstraram que os plasmatócitos e granulócitos são os principais tipos de hemócitos encontrados em microagregados, os quais representam os primeiros estádios do processo de nodulação. Como em nossos estudos nós não analisamos períodos mais longos de infecção, não podemos descartar a hipótese de que outros hemócitos, particularmente os oenocitóides, observados próximos dos sítios de microagregação possam participar mais tardiamente deste processo.

Um fato interessante evidenciado em nosso estudo foi a presença de oenocitóides no interior de plasmatócitos. Este fenômeno também foi descrito por outros autores tanto em outros triatomíneos (BARRACO; LOCH, 1989; HYPISA; GRUBHOFFER, 1997) quanto no próprio *R. prolixus*. (WIGGLESWORTH, 1933, 1937; JONES, 1965). Assim os plasmatócitos de *R. prolixus*, além de apresentarem

---

importante função na ingestão de partículas estranhas, podem também contribuir para a remoção de células apoptóticas e/ou senescentes da circulação.

No presente estudo, nós demonstramos que a infecção de *R. prolixus* com bactérias causa drásticas alterações nos plasmatócitos, oenocitóides e adipohemócitos. Estas alterações sugerem que a resposta imune destes insetos frente a partículas estranhas envolve numerosas etapas de transdução de sinais bem como consumo de energia. Consistentemente, a ausência de inclusões lipídicas e o consumo das partículas de glicogênio aliado ao aumento das mitocôndrias em adipohemócitos de animais desafiados podem indicar que tanto o glicogênio quanto os lipídios possam estar sendo utilizados como fonte de energia permitindo que estas células possam fazer frente aos diferentes desafios imunológicos. As modificações sofridas pelos plasmatócitos estão de acordo com função que esta célula desempenha tanto na fagocitose (LING; YU, 2005) quanto na formação de nódulos (RATCLIFFE; ROWLEY, 1979). Nossos dados sugerem que as alterações no citoesqueleto e em organelas tais como as mitocôndrias, as quais tornam-se extremamente delgadas e fortemente associadas a microtúbulos, em plasmatócitos de animais desafiados, possam ser utilizados como parâmetros de ativação deste tipo celular em *R. prolixus*. Apesar de podermos inferir através da análise ultraestrutural, que as mudanças morfológicas encontradas em oenocitóides, plasmatócitos e adipohemócitos também sejam acompanhadas de uma profunda alteração bioquímica e fisiológica sofridas por estas células em resposta a infecção, a natureza destas alterações ainda precisa ser esclarecida. Em várias espécies de insetos, tais como *M. sexta* e *P. includens*, a profenoloxidase, a enzima chave do processo de melanização é encontrada exclusivamente nos oenocitóides e liberada na hemolinfa por ruptura destas células (PECH *et al.*, 1994; JIANG *et al.*, 1997). No nosso estudo, a existência de vesículas eletrilucidas fundindo-se com a membrana plasmática em oenocitóides ativados sugere que o conteúdo destas vesículas, provavelmente correspondente a profenoloxidase, é descarregada na hemolinfa por fusão das vesículas com a membrana plasmática e não por ruptura da célula, levando a melanização de *S. aureus* observada nos nossos experimentos. Porém são necessários estudos mais específicos para elucidar este fato.

---

## 6 CONCLUSÕES

- A análise da hemolinfa de *Rhodnius prolixus* através da microscopia eletrônica demonstrou a presença de seis tipos distintos de hemócitos: prohemócito, plasmatócito, oenocitóide, granulócito I e II, adipohemócito;
  - A L. A. pode ser utilizada na discriminação dos diferentes tipos de hemócitos em *R. prolixus*, através da microscopia óptica de fluorescência, sendo uma técnica rápida que garante a viabilidade celular;
  - Nossos resultados demonstraram que os plasmatócitos são as únicas células com atividade fagocítica em *R. prolixus* frente ao desafio com partículas de látex e com bactérias;
  - As semelhanças encontradas entre os tipos de fagocitose em células de mamíferos e as encontradas em hemócitos de *R. prolixus* sugerem que este processo seja desencadeado por moléculas altamente conservadas que atuem como receptores de reconhecimento padrão (plasmatócito) e moléculas padrão (bactérias), promovendo a interiorização das mesmas por processos distintos de fagocitose;
  - Tendo em vista que partículas de látex não apresentam moléculas padrões, é possível que proteínas da hemolinfa se adsorvam a superfície destas partículas agindo como opsoninas;
  - As alterações morfológicas encontradas em plasmatócitos, oenocitóides e adipohemócitos sugerem o envolvimento de numerosas etapas de transdução de sinais e aumento do consumo de energia.
-

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEREM A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Ann. Rev. Immunol.** V. 17, p. 593-623, 1999.

ANGGRAENI, T.; RATCLIFFE, N. A. Studies on cell-cell cooperation during phagocytosis by purified haemocyte populations of the wax moth *Galleria mellonella*. **J. Insect Physiol.** V. 37, p. 453-460, 1991.

[AZAMBUJA, P. et al.](#) Immune responses in *Rhodnius prolixus*: influence of nutrition and ecdysone. **J. Insect Physiol.** n. 43, p. 513-519, 1997.

AZAMBUJA, P.; GRACIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A. Aspects of hemiptera hemocytes from six species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** V. 86, p. 1-10, 1991.

[AZAMBUJA, P.; RATCLIFFE, N. A.; GARCIA, E.S.](#) Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. **An Acad. Bras. Cienc.** V. 77(3) p. 397-404. Review. 2005

BARRACO, M. A.; OLIVEIRA, R.; SCHLEMPUR JR, B. The hemocytes of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** V. 82, n. 3, p. 431-438, 1987.

[BARRACCO, M. A.; LOCH, C. T.](#) Ultrastructural studies of the hemocytes of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). **Mem. Inst Oswaldo Cruz,** 84, p. 171-88, 1989.

BAYNE, C. J. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. **Bio-science.** V. 40, p. 723-731, 1990.

BEEMAN, S. C. *et al.* Structural characterization of hemocytes of *Plodia interpunctella*. **J. Morpholol.** v. 175, p. 1-16, 1983.

BENTO, D. N. *et al.* The epidemiology of Chagas' disease in a rural area of the city of Teresina, Piauí, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 25, p. 51-58, 1992.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol. Immunol.** V. 40, P. 845-859, 2004.

BILLINGSLEY, P. F.; DOWNE, A. E. The effects of artificial diets on the anterior intestinal cell ultrastructure of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Int. J. Parasitol.** V. 19, p. 291-299, 1989.

---

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* V. 12, p. 64-76, 2000.

BRAYNER, F. A.; *et al.* Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: culicidae). *Micron*, v.36, p. 359-367 BARRACO, 2004.

BRAYNER, F. A.; *et al.* Hemocyte population and ultrastructural changes during the immune response of *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae) to microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. *Méd. Vet. Entomol.* 2006. (no prelo)

BREHELIN, M.; ZACHARY, D. Insect hemocytes: A new classification to rule out controversy. In: *Immunity in invertebrates*. Springer verlag. P. 36-48, 1986.

BRUMPT, E. Le xenodiagnostique. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier a la trypanosome de Chagas. *Bulletin de la société de pathologie exotique*. V. 7, p. 706-710, 1914.

CANAVOSO, L. E.; RUBIOLLO, E. R. Metabolic post-feeding changes in fat body and hemolymph of *Diptelogaster maximus* (Hemíptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. V. 93, p. 225-230, 1998.

[CAÑETE, M.](#) *et al.* Fixation and permanent mounting of fluorescent probes after vital labelling of cultured cells. [Acta Histochem.](#) v.103, p.117-26, 2001

CERENIUS, L.; SODERHALL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* V. 198, P. 116–126, 2004.

CHAGAS, C. Nova tripanomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do schizotrypanum cruzi, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. V. 1, p. 159-218, 1909.

CHAIN, B. M.; LEYSHON-SOLAND, K.; SIVAJOTHY, M. T. Haemocyte heterogeneity in the cockroach *Periplaneta americana* analyzed using monoclonal antibodies. *J. Cell. Sci.* V. 103, p. 1261-1267, 1992.

CLEMENTS, A. N. Adult digestion In. *The biology of mosquitoes* 1a. ed. Chapman and Hall, New York. P. 272-291, 1992.

COCIANCICH, S. *et al.* The inducible antibacterial peptides of insect. *Parasitol. Today*. V. 10, p. 132-139, 1994.

---

COSTA, S. C. P. *et al.* Modes of phagocytosis of Gram-positive and Gram-negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes. **J. Insect Physiol.** n. 51, p.39-46, 2005.

DA SILVA, J. B. *et al.* Immune defense mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida albicans* infection. **J. Invert. Pathol.** V. 76, p. 257-262, 2000b.

[DA SILVA, C.](#); [DUNPHY, G.B.](#); [RAU, M. E.](#) Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Dev Comp Immunol.** V. 24, N. 4, P. 367-79, 2000.

DEAN, P. *et al.* Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta*. **J Insect Physiol.** V.50, N. 11, P.1027-1036, 2004.

DUJARDIN, J. P. *et al.* The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America. **Medical & Veterinary Entomology.** V. 12, p. 113-115, 1988.

[FOGLIENI, C.](#), [MEONI, C.](#), [DAVALLI, A.M.](#) Fluorescent dyes for cell viability: an application on prefixed conditions. **Histochem. Cell Biol.** v.115, p.:223-229, 2001

FORANTTINNI, O. *et al.* Aspectos ecológicos da tripanosomose americana I. Observações sobre o *Panstrongylus megistus* e suas relações com os focos naturais da infecção, em áreas urbanas na Cidade de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.** v. 4, p.19-30, 1970.

FURTADO, A. F.; VIEIRA, G. D.; CARVALHO, A. B. The hematopoietic organs of Triatominae. In: **Reunião anual sobre pesquisa em doença de Chagas**, XI, Caxambú, MG. V. 13, 1984.

[FRYER, S. E.](#); [BAYNE, C.J.](#) Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by adsorbed plasma components. **Dev Comp Immunol.** v. 20, p.23-37., 1996

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol. Today.** V. 7, p. 240-244, 1991.

GARCIA, M. L.; MELLO, R. P.; GARCIA, E. S. Ecdysone juvenile hormone and oogenesis in *Rhodnius prolixus*. **J. Insect Physiol.** V. 25, p. 695-700, 1979.

GARDINER, E. M. M.; STRAND, M. R. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. **Arch. Ins. Biochem. Physiol.** V. 43, p. 147-164, 2000.

GARIN, J. *et al.* The phagosome proteome: insight into phagosome functions, **J. Cell Biol.** V. 152, P. 16–180, 2001.

---

GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Ann. Ver. Entomol.** V. 42, p. 611-643, 1997.

GIULIANINI P. G. *et al.* Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): Involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis. **Tissue Cell.** V. 35,n .4, p. 243-51, 2003.

GOTZ, P. Encapsulation in Arthropods. In: **Immunity in invertebrates: Cells, molecules and defense reactions**, ed. M Brehelín. P. 153-170, 1986.

GREENBERG, S.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis and innate immunity, **Curr. Opin. Immunol.** V. 14, P. 136–145, 2002.

[GREWAL, M. S.](#) Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. **Exp Parasitol**, n.6, p. 123-30, 1957.

GULLAN, P. J. & CRANSTON, P. S. External anatomy. In: The insect na outline of entomology, 2<sup>a</sup> ed. P. 21-50, 1994.

GUPTA, A.P.; SUTHERLAND, D.J. Phase contrast and histochemical studies of spherule cells in cockroaches (Dictyoptera). **Ann Entomol Soc Am.** V. 60, N.3, P.557-565, 1967.

GUPTA, A. P. Cellular elements in hemolymph. In: **Compreensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**, Pergamon Press, Oxford. V. 3, p. 401-455, 1985.

GUPTA, A. P. Hemocytic and humoral immunity. In: **Arthropod immunity**. Ed. Wiley, New York.p. 230-250, 1986

HAM, P. J. Immunity in haematophagous insect vectors of parasitic infection. **Adv. Vector Res.** V. 9, p. 101-149, 1992.

[HERBIG-SANDREUTER A.](#) - Further studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera1920. **Acta Trop**, n. 14, p. 193-207, 1957.

HERNANDEZ, S. *et al.* Morphological and citochemical characterization of female *Anopheles albimamus* (Diptera: Culiciidae) hemocytes. **J. Med. Entomol.** V. 36, p. 426-434, 1999.

HERNADEZ-MARTINEZ, S. *et al.* Cellular-mediated reactions to foreign organisms inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol.** V. 39, n. 1, p. 61-9, 2002.

HETRU, C.; HOFFMAN, D.; BULET, P. Antimicrobial peptides from insects. In **Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects**, ed. TB Brey, D Hultmark. P. 40–66. London: Chapman & Hall 1998.

---

[HETRU, C.](#); [TROXLER, L.](#); [HOFFMANN, J. A.](#) *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. **J Infect Dis.** V. 2, P. 327-334, 2003.

HILLYER, J. F.; SCHMIDT, S. L.; CHRISTENSEN, B. M. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. **Cell Tissue Res.** V. 313, N.1, p.117-127, 2003.

[HILLYER, J. F.](#); [SCHMIDT, S. L.](#); [CHRISTENSEN, B. M.](#) The antibacterial innate immune response by the mosquito *Aedes aegypti* is mediated by hemocytes and independent of Gram type and pathogenicity. **Microbes Infect,** n. 6, p. 448-59, 2004.

HYPASA, V.; GRUBHOFFER, L. Two hemocytes population in *Triatoma Infestans*: ultrastructural and lectin-bind characterization. **Fol. Parasitol.** V. 44, p. 62-70, 1997.

HOFFMAN, J. A. Les organes hematopoietic de deux insect Orthopteres: *Locusta migratoria* et *Grillus bimaculatus*. *Z. Zelforsch. Mikrosk. Anat.* V. 106, p. 451-472, 1970.

HOFFMAN, J. A. Innate immunity of insects. **Curr. Opin. Immunol.** V. 7, p. 4-10, 1995.

HOFFMAN, J. A.; HETRU, C.; REICHHART, J. M. The humoral antibacterial response of *Drosophila*. **Febs Lett.** V. 325, p. 63-66, 1993.

HOFFMAN, J. A. *et al.* Postembryonic development and differentiation: hematopoietic tissues and their functions in some insects. In: *Insect hemocytes* (Gupta, A. P., ed.). **Cambridge university Press**, USA. P. 4-26, 1979.

HUXHAM, I. M.; LACKIE, A. M. Behaviour In vitro of separated fractions of haemocytes of the locust *Schitocerca gregaria*. **Cell. Tissue Res.** V. 251, p. 677-684, 1988.

HYPASA, V.; GRUBHOFFER, L. Two hemocytes population in *Triatoma Infestans*: ultrastructural and lectin-bind characterization. **Fol. Parasitol.** V. 44, p. 62-70, 1997.

[JIANG, H.](#), [WANG, Y.](#), [MA, C.](#), [KANOST, M.R.](#) Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: Molecular cloning of subunit ProPO-P1. **Insect Bioch. Mol. Biol.** v. 27, p. 835-850, 1997.

JONES, J. C. The hemocytes of *Rhodnius prolixus*. **Biol. Bull.** V. 129, p. 282-294, 1965

KURTZ J Phagocytosis by invertebrate hemocytes: Causes of individual variation in *Panorpa vulgaris* *Scorpionflies* , **Micr. Res.** Tech. V. 57, p. 456-468, 2002.

---

LACKIE, A. M. Hemocyte behaviour. **J. Insect Physiol.** V. 21, p. 85-178, 1988.

LANOT, R. *et al.* Postembryonic hematopoiesis in *Drosophyla*. **Dev. Biol.** V. 230, p. 243-257, 2001.

[LAVINE, M. D.; CHEN, G.; STRAND, M. R.](#) Immune challenge differentially affects transcript abundance of three antimicrobial peptides in hemocytes from the moth *Pseudaletia includens*. **Insect Biochem Mol Biol**, n. 35, p. 1335-46, 2005.

LAVINE, M. D.; BECKAGE, N. E. Polydnviruses: potent mediators of host insect immune dysfunction. **Parasitol. Today.** V. 11, p. 368-378, 1995.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem. And Molecular Biology.** v. 32, p. 1295-1309, 2002.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significances as vector of Chagas disease. **Bull American Mus. Nat. Hist.** V. 163, n. 3, p. 347-352, 1979.

LEMAITRE, B.; KROMER-METZGER, E.; MICHAUT, L. A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. **Proc Natl Acad Sci USA.** V. 92, P. 9465–9469, 1995.

LOPES, L. *et al.* Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. **Insec.Biochem.Mol. Biol.** V.33, p.439-447, 2003

LOWENBERGER, C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** V. 31, p. 219-229, 2001.

[LING E, SHIRAI K, KANEKATSU R, KIGUCHI K.](#) Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining. **Histochem Cell Bio** IV.120, N. 6, P.505-511, 2003.

[LING E, SHIRAI K, KANEKATSU R, KIGUCHI K.](#) Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. V. 320, N. 3, P.535-543, 2005

[LING, E.; YU, X.Q.](#) Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immunectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Dev Comp Immunol.** V. 30, N. 3, P. 289-299, 2005.

MADDRELL, S. H.; GARDINER, B. O. Excretion of alkaloids by malpighian tubules of insects. **J. Exp. Biol.** V. 64, p. 267-281, 1976.

MADDRELL, S. H.; GEE, J. D. Potassium induced release of the diuretic hormones of *Rhodnius prolixus* and *Glossina austem*. Ca dependence, time course and localization of neurohaemal areas. **J. Exp. Biol.** V. 61, p. 155-171, 1974.

---

MAY, R. C.; MACHESKY, L. M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton, **J. Cell Sci.** V. 114, P. 1061–1077, 2001.

MCKENZIE, A. N. J.; PRESTON, T. M. Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined by lectin staining and density centrifugation. **Dev. Comp. Immunol.** V. 16, p. 19-30, 1992.

MEISTER, M.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A. The antimicrobial host defense of *Drosophila*. In: Origin and evolution of the vertebrate immune system. **Current Topics in Microbiology**, Berlim. V. 248, p. 17-36, 2000.

MIRANPURI, G.S.; BIDOCHKA, M.J.; KACHATOURIANS, G. C. Morphology and cytochemistry of hemocytes and analysis of hemolymph from *Melanoplus sanguinipes* (Orthoptera: Acrididae). **J Econ Entomol.** V. 84, P.371-378, 1991.

MIZUGUCHI, K. *et al.* Getting knotted: a model for the structure and activation of Spatzle. **Trends Biochem Sci.** V. 23: 239–42. 1998

MORTON, D.; DUNPHY, G.; CHADWICK, J. Reactions of haemocytes of immune and non-immune *Galleria mellonella* larvae to *Proteus mirabilis*. **Dev. Comp. Immunol.** V. 11, p. 47-55, 1987.

MULLETT, H.; RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F. The generation and characterisation of anti-insect blood cell monoclonal antibodies. **J. Cell. Sci.** v. 105, p. 93-100, 1993.

MUTA, T.; IWANAGA, S. The role hemolymph coagulation in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.** V. 8, p. 41-47, 1996.

[NAPPI, A. J.](#); [FREY, F.](#); [CARTON, Y.](#) *Drosophila* serpin 27A is a likely target for immune suppression of the blood cell-mediated melanotic encapsulation response. **J Insect Physiol**, n. 51, p. 197-205, 2005.

OTHA, M. *et al.* Mechanism by which *Bombyx mori* hemocytes recognize microorganisms: direct and indirect recognition systems for PAMPs. **Dev Comp Immunol.** 2006 (in press)

OLIVEIRA, M.A. Fase hemocitária do ciclo de vida do *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920), no seu hospedeiro invertebrado *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859). (tese) 1999

OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. (). Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. **Parasitol. Intern.** V. 52, p. 299-307, 2003.

PASKEWITZ, S. M.; CHRISTENSEN, B. M. The biological of disease vectors. In: **Immune response of vectors**. Univ. Press Colorado. P. 371-392, 1996

---

PAZ-BAILEY, G. *et al.* Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection in two Guatemalan communities. **Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene.** V. 96, p. 42-52, 2002.

[PECH LL](#), [TRUDEAU D](#), [STRAND MR](#). Separation and behavior in vitro of hemocytes from the moth, *Pseudoplusia includens*. **Cell Tissue Res.** v. 277, p. 159-167, 1994

PECH, L. L.; STRAND, M.R. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. **J Cell Sci.** V. 109, P. 2053–2060, 1996.

PONCE, C. *et al.* Ensayos de intervencion con nuevas herramientas para el control de la enfermedad de Chagas em Honduras. In: **Nuevas estrategias para el control vectorial de la enfermedad de Chagas em Honduras, Tegucigalpa**, Ministerio de la salud pública. P. 10-16, 1995.

RATCLIFFE, N. A.; GAGEN, S. J. Studies on the in vivo cellular reactions of insect: an ultrastructural analyses of nodule formation in *Galleria mellonella*. **Tissue and Cell.** V. 9, p. 73-85, 1977.

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F. Role of haemocytes in defense against biological agents. In: **Insect haemocytes: development, forms, functions and techniques.** Ed. Cambridge University Press. P. 331-414, 1979.

RATCLIFFE, N. A. *et al.* Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Symp. Zool. Soc. Lond.** V. 56, 1985.

RATCLIFFE, N. A.; WALTERS, J. B. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: clearance of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria melonella* larvae. **J. Insect Physiol.** V. 29, p. 407-415, 1983.

RIBEIRO, C.; SIMÕES, N.; BREHÉLIN, M. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepdoptera: Noctuidae) and their role in defense reactions. In vivo and In vitro studies. **J. Insect Physiol.** V. 42, p. 815-822, 1996.

SALT, G. The cellular defense reactions of insects. London: Cambridge Univ. Press. 118p. 1970.

SCHOFIELD, C.J., Triatominae, Biología y Control. Eurocommunica Publications, West Sussex, UK, p. 76, 1994.

STAL, C. Monographie der Gattung Conorhinus und Verwandten. Berliner entomologischer Zeitschrift. V. 3, p. 99-117, 1859.

STRAND, M. R.; JOHNSON, J. A. Characterization of monoclonal antibodies to hemocytes of *Pseudoplusia includens*. **J. Insect Physiol.** V. 42, p. 21-31, 1996.

---

STRAND, M. R.; PECH, L. L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annu. Rev. Entomol.** V. 40, p. 31-56, 1995.

TAVARES, O. Nota sobre a presença do *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, no estado de São Paulo, Brasil. **Ver soc Brasil Méd Trop**, V. 5, n. 6, p. 319-322, 1971.

TEPASS, U.; FESSLER, L. I.; AZIS, A.; HARTENSTEIN, V. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophyla*. **Development.** V. 120, p. 1829-1837, 1994.

TOJO, S. *et al.* Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **J. Insect Physiol.** V. 46, p. 1129-1135, 2000.

TRENCZEK, T.; BENNICH, H. Characterization of immune competent hemocytes by monoclonal antibodies. In: **Molecular Insect Science**, New York: Plenum. P. 372, 1990.

[UNDERHILL, D.M.](#), [OZINSKY, A.](#) Phagocytosis of microbes: complexity in action. [Annu Rev Immunol.](#) v.20, p.825-852, 2002.

VASS, E. & NAPPI, A. J. Fruit fly immunity. **Bioessays.** V. 51, p. 529-535, 2001.

VILCINSKAS, A.; MATHA, V.; PETER, G. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. **J. Insect Physiol.** V. 43, p. 475-483, 1997

WAGO, H. Phagocytic recognition in *Bombyx mori*. In: **Immunity of insects and other arthropods**, ed. AP Gupta, Boca Raton: CRC Press. P. 215-235, 1991.

WIEGAND, C. *et al.* Monoclonal antibody MS13 identifies a plasmatocytes membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. **Arch. Insect. Biochem. Physiol** v. 45:95-108, 2000.

WIGGLESWORTH, V. B. The physiology of the cuticle and of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Triatomidae: Hemiptera), with the special reference to the function of the oenocytes and of the dermal glands. **Q. J. Microsc. Sci.** V. 76, p. 269-318, 1933.

[WIGGLESWORTH, V.B.](#) Secretory activities of plasmatocytes and oenocytoids during the moulting cycle in an insect (*Rhodnius*). **Tissue Cell**, n. 11, p. 69-78, 1979.

WIGGLESWORTH, V. B. Wound healing in an insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). **J Exp. Biol.** V. 32, p. 649-663, 1937.

---

[WIGGLESWORTH VB.](#) Source of moulting hormone in *Rhodnius*. **Nature**, n. 29, 1951.

WILLOTT, E. *et al.* Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca Sexta*. **Eur. Cell. Biol.** V. 65, p. 417-423, 1994.

YAMASHITA, M., IWABUCHI, K. *Bombix mori* prohemocytes division and differentiation I n individual microcultures. **J.Ins. Physiol.** v. 47, p. 325-331. 2001.

[ZELEDON R, SILVA S.](#) Attempts to culture the parasitic stage of *Dermatobia hominis* (L. Jr.) in vitro (Diptera: Cuterebridae). **J Parasitol.** n. 73, p. 907-9, 1987.

---

## **Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus***

Borges A.R.<sup>1</sup>, Santos P.N.<sup>1</sup>, Furtado A.F.<sup>2</sup>, Figueiredo R.C.B.Q.<sup>1\*</sup>

<sup>1\*</sup>Departamento de Biologia Celular e Ultraestrutura, \*\* Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Campus da UFPE, 50670-420, Recife, Brazil

\*Corresponding author

Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo  
Departamento de Biologia Celular e Ultraestrutura  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
Av. Moraes Rego s/n – Campus da UFPE  
50670-420 Recife  
Pernambuco, Brazil  
e-mail: [bressan@cpqam.fiocruz.br](mailto:bressan@cpqam.fiocruz.br)  
Tel: +55 81 21012556  
Fax: +55 81 3453 2449

---

### **ABSTRACT**

Insect circulating hemocytes are primarily responsible for the immune defense against parasites and pathogens. Here we have analyzed phagocytosis of both biotic (bacteria) and abiotic (latex particles) particles by circulating hemocytes of 5<sup>th</sup>-instar nymphs of the triatomine bug *Rhodnius prolixus*. The following hemocyte types were identified: prohemocytes, plasmatocytes, type I granulocytes, type II granulocytes, oenocytoids and adipohemocytes. There was a considerable change in the relative percentage of plasmatocytes and prohemocytes in the hemolymph after challenge with both latex beads and bacteria. Our data demonstrated that plasmatocytes were the only cell type involved in phagocytosis of foreign particles. As in mammal cells, phagocytosis by both zipper and trigger mechanisms were observed for the uptake of latex beads and bacteria. Neither melanization nor micro-aggregation were observed towards latex particles or *Escherichia coli*. On the other hand, *R. prolixus* produced a strong melanization reaction against *Staphylococcus aureus*, thus showing that differences exist in the responses to *E. coli* and to *S. aureus*. Ultrastructural changes observed in plasmatocytes, adipohemocytes and oenocytoids suggest that these hemocyte types are directly involved in the immune defense of *R. prolixus* against foreign particles.

**Keywords:** hemocytes, phagocytosis, ultrastructure, *Rhodnius prolixus*

---

## INTRODUCTION

Immunity in insects consists of both humoral and cellular defense reactions (Gillespie et al., 1997; Lavine and Strand, 2002). Antibacterial proteins and other immune-related molecules, mainly secreted by the fat body and partly by hemocytes, build the humoral immunity (Bulet et al., 1999), while circulating hemocytes mediate the cellular immunity through phagocytosis, encapsulation and nodule formation (Lavine and Strand, 2001, Lavine and Strand, 2002). Phagocytosis, the process by which cells engulf large particles from the environment, is essential for host defense against infectious microorganisms and for the clearance of apoptotic cells generated during development, being considered the main cellular reaction of innate immunity in vertebrates and invertebrates (Silverstein, 1995; Allen and Aderem, 1996; Aderem and Underhill, 1999; Fadok and Chimini, 2001; Kurtz, 2002). Insect plasmatocytes and/or granulocytes are major hemocytes types involved in phagocytosis, but other hemocytes such as oenocytoids may also engulf bacterial cells (Giulianini et al., 2003; Ling and Yu, 2005).

There are multiple modes of phagocytosis, which are mediated by the particles to be ingested and by the receptors that recognize them (Swanson and Baer, 1995). In zipper phagocytosis, mediated via Fc receptors, lamellipodia protrude from the cell surface and the resulting phagosome is tightly apposed to the particle. In triggering phagocytosis, mediated via complement receptors, particles seem to sink directly into the cell and the phagosome membrane may adhere to a lesser degree to the particle. A third morphological process, macropinocytosis, is accompanied by membrane ruffling, leading to the formation of large phagosomes enclosing both particle and extracellular fluid. It has been shown that both zipper and trigger mechanisms, as well as macropinocytosis, are involved in phagocytosis of Gram-positive and Gram-negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular hemocytes (Costa et al., 2005).

The triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) is an important vector of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease. In addition, it is also a vector of *Trypanosoma rangeli*, which is apparently non-pathogenic for humans, but can be pathogenic to the triatomines (Azambuja and Garcia, 2005). For this reason, most studies carried out on *R. prolixus* immunity are focused on the immune response of this insect against *T. rangeli*. A transmission electron microscopy study showed that plasmatocytes were able to ingest *T. rangeli* epimastigote forms, which were found within a parasitophorous vacuole. Apparently, fusion of host cell lysosomes with the parasitophorous vacuole took place, and parasites in process of digestion were observed (Oliveira and De Souza, 2003).

---

Despite the importance of these studies, little is known on the phagocytosis of other foreign targets by *R. prolixus* hemocytes, as well as the phagocytic process itself. The aim of the present study was the characterization, by using electron microscopy analysis, of the cellular response mounted by *R. prolixus* after immunological challenge with abiotic and biotic targets.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Insects**

*Rhodnius prolixus* insects were reared in the laboratory at 28°C and relative humidity of 60-70%. Randomly chosen 5th-instar nymphs were fed on chicken blood, four days before the immune challenge. Only fully engorged insects were used throughout the experiments.

### **In vivo phagocytic assay**

Ten  $\mu$ L of carboxylate-modified polystyrene latex beads, 0.3  $\mu$ m in diameter, (aqueous solution, 10% solids content, Sigma Co, St. Louis, MO, USA) were diluted 1:10 in sterile phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) and then injected with a 26-gauge needle into the thoracic segment of fifth instar nymphs. Gram-negative *Escherichia coli* and Gram-positive *Staphylococcus aureus* bacteria cultures were grown at 37°C in Brain Heart Infusion medium (Difco, USA) or nutrient agar, respectively. Bacterial cells were harvested from cultures at the exponential phase of growth, washed three times and resuspended in PBS at  $2 \times 10^8$  cells/mL. Ten  $\mu$ L of the bacterial suspension were injected as described for latex beads.

After 30, 60 and 120 minutes the hemolymph from 20 insects was collected directly into a fixative solution consisting of 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (pH 7.2) and then processed for transmission electron microscopy as described below. Furthermore, differential countings of hemocyte types were performed in Giemsa-stained smears from each experimental schedule, at the light microscopy level. Cells in 20 fields (objective 100X) were counted and the relative percentage of each cell type was then estimated. Countings were performed in triplicate. Non-inoculated insects were used as a control.

### **Transmission electron microscopy (TEM)**

For transmission electron microscopy, hemocytes were pelleted by gentle centrifugation (4 min at 800g) and fixed for 1 hour at room temperature with 2.5% glutaraldehyde / 4% paraformaldehyde in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2. After fixation, cells were washed in the same buffer and post-fixed for 1 hour at room temperature with 1% OsO<sub>4</sub> / 0.8% potassium ferricyanide, 5 mM CaCl<sub>2</sub> in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2. The samples were then washed three times in the same buffer, dehydrated in acetone and embedded in Epon. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed in Zeiss EM 109 transmission electron microscope at 80 kV.

---

## RESULTS

### Hemocyte types and morphology

Six hemocyte types were observed in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* and they were identified as prohemocytes, plasmatocytes, oenocytoids, adipocytes and types I and II granulocytes. The relative percentage of circulating hemocyte types from inoculated and non-inoculated insects are summarized in Table 1. Plasmatocytes, followed by prohemocytes and oenocytoids, were the most common cells in untreated insects. The less abundant cell types were granulocytes and adipohemocytes. Since we were unable to discriminate type I from type II granulocytes at the light microscopy level, they were counted as a single granulocyte population.

Prohemocytes displayed a round/oval profile, being characterized by a high nucleus/cell ratio. The nucleus presented a condensed chromatin, while the cytoplasm presented few endoplasmic reticulum profiles and small electron-dense mitochondria (Fig. 1A).

Plasmatocytes were the most abundant hemocytes in the hemolymph of both treated and untreated insects. Their relative percentage increased in treated insects, regardless the nature of the ingested particles. They presented a polymorphic profile, with the nucleus located at a central or pericentral position. Heterochromatic patches were observed attached to the nuclear envelope. The cytoplasm contained widespread microtubules, rough and smooth endoplasmic reticulum profiles, Golgi complex and a number of elongated mitochondria. Membrane ruffles were also observed. The main feature of plasmatocytes was the presence of round membrane-bound vesicles with heterogeneous matrix. These vesicles were easily distinguished by their size and electron-density from those found in granulocytes (Fig.1B).

Oenocytoids were oval-shaped cells and generally presented a homogeneous electron dense cytoplasm with few organelles. Only a few endoplasmic reticulum profiles and scarce mitochondria could be observed. The centrally located nucleus had an oval to round profile with electron lucent nucleoplasm and heterochromatic clumps firmly attached to the nuclear envelope. Characteristic of this cell type was the presence of a number of membrane-bound vesicles with intermediary electron-density and regular size, located just beneath the plasma membrane (Fig. 1C).

Adipohemocytes contained a small nucleus with a well-defined nucleolus. Several large lipid droplets were observed immersed in the cytoplasm. Other organelles such as rough and smooth endoplasmic reticulum and Golgi complex were also observed. Small mitochondria were randomly dispersed throughout the cytoplasm. The remaining cytoplasm was covered with large amounts of electron-dense glycogen particles, arranged in alpha configuration (Fig. 1D).

---

The main characteristic of granulocytes was the presence of a number of granules with different sizes and electron-density. On this basis, granulocytes could be further subdivided in Type I or Type II cells. Type I granulocytes were filled with a variable number of granules with a high to middle electron-dense matrix, enclosed or not by a membrane. Some of these granules, presenting middle level electron-density, were always surrounded by a membrane and the matrix showed microtubular profiles (Fig.1E). Type II cells showed a more dense cytoplasm when compared to type I cells. The granules were always concentrated at the cell periphery, some of them presenting a paracrystalline structure with no evident membrane (Fig.1F). Both type I and type II granulocytes presented a polymorphic nucleus, with an apparent polymorphic nucleolus. The cytoplasm usually contained a variable number of mitochondria, Golgi complex, endoplasmic reticulum and abundant ribosomes. Membrane ruffles and a number of electron-lucent vesicles of different sizes were usually seen, suggesting the presence of a strong endocytic activity (Fig. 1E-F).

### **Phagocytosis assay**

To identify which hemocyte types were involved in the phagocytosis of foreign particles, an *in vivo* phagocytosis assay was performed by injecting latex beads or live bacteria into fifth instar nymphs (Figs. 2-4). The profile of plasmatocytes and prohemocytes considerably changed after immune challenge, when compared with non-challenged insects, regardless the nature of the inoculated particle (Table1). The relative percentage of plasmatocytes increased, whereas a decrease of prohemocytes was observed. An increase in the percentage of granulocytes was observed only in latex-inoculated insects. The percentage of other hemocyte types was little or not affected by the inoculation of latex beads or bacteria.

Transmission electron microscopy demonstrated that only plasmatocytes were able to phagocytose both latex beads and bacteria (Figs. 2-4). Phagocytosis of latex beads could be observed as early as 30 minutes post-inoculation, within close fitting phagosomes (Fig. 2A). Plasmatocytes showed an active phagocytic activity, with phagosomes containing single or several latex beads. Large phagolysosome-like structures with electron-dense matrix and containing up to 10 latex beads were also observed (Fig. 2A). Latex beads were individually interiorized by a trigger-like mode of phagocytosis, without any apparent lamellopodia protrusion surrounding the particles (Fig. 2B). After 120 min. several plasmatocytes with their cytoplasm filled with latex beads presented plasma membrane rupture (data not shown). Neither melanization nor aggregation of latex particles were observed at any experimental time. Except

---

by the plasmatocytes, no evident morphological changes could be observed in the other hemocyte types in latex-inoculated insects.

Plasmatocytes efficiently phagocytosed *E. coli*, and the number of bacteria inside them varied from 2 to 10. However, not all cells were shown to be actively phagocytic. *E. coli* phagocytosis was observed as early as 30 min. post-inoculum (Fig. 2C) and occurred by a zipper-like mechanism (Fig 2C-F). Intracellular bacteria with variable degrees of degeneration were commonly seen at 120 min. post-challenge (Fig. 2D). Multivesicular bodies containing membrane profiles were usually observed in phagocytic plasmatocytes (Fig. 2 D). An increase of vesicles compatible in appearance with endocytic vesicles, as well as membrane ruffles indicative of macropinocytosis, were also observed (Fig. 2D).

At 30 minutes post challenge, *S. aureus* elicited a strong hemocyte aggregation (Fig. 3A) and melanization (Fig. 3B), but only a weak phagocytic activity could be observed. The number of phagocytosed bacteria never exceeded an average of 2 bacteria per cell (Fig.3D). Only unmelanized bacteria could be found inside tight phagosomes (Fig. 3D). The plasmatocytes present in the nodules usually emitted long and thin cytoplasmic projections that occasionally completely surrounded granulocytes (Fig. 3A). This reaction was more evident 120 min. post-inoculation. The only two hemocyte types observed in micro-aggregates were plasmatocytes and granulocytes (Fig. 3A). Occasionally, oenocytoids were seen close to the micro-aggregation sites (data not shown). At 30 and 60 min. post-challenge several bacteria had been also melanized (Fig. 3B), a process that was enhanced after 120 min. of incubation. Phagocytosis of *S. aureus* occurred primarily by a zipper-like process, although membrane ruffles resembling macropinocytosis were also observed in plasmatocytes containing phagocytosed bacteria (Fig. 3C). After 120 min., bacteria presenting signals of degradation, such as darkening and the presence of amorphous material inside the phagosomes, could be observed (Fig. 3C).

At least three hemocyte types underwent drastic morphological changes after the inoculation with bacteria: plasmatocytes, oenocytoids and adipohemocytes. The alterations were more evident in insects inoculated with *S. aureus*. The major morphological alterations found in plasmatocytes were an increase of multivesicular structures, an increase of pinocytic activity, and clustering of mitochondria (Fig. 4A-B). In some cases, mitochondrial clusters were seen inside large vacuoles resembling autophagosomes (Fig. 4A) Activated adipohemocytes presented an increase in the number of mitochondria and a significant decrease of glycogen particles. Lipid droplets were absent in these cells, and they were replaced by electron-lucent spaces, which were similar in size to the missing lipid droplets (Fig. 4C).

---

In most activated oenocytoids the vesicles at the cytoplasm periphery presented an electron-lucent appearance and some of them were found fusing with the plasma membrane (Fig. 4D).



## DISCUSSION

Insect hemocytes are able to phagocytose both biotic particles, such as bacteria, yeasts and apoptotic cells, as well as small abiotic targets such as synthetic beads or India ink particles (Lavine and Strand, 2002). The hemocyte types involved in phagocytosis vary among the insect groups and the identification of the cell types responsible for this task is in some cases controversial. A previous study has shown that *R. prolixus* plasmatocytes efficiently phagocytosed the flagellate protozoan *Trypanosoma rangeli* (Oliveira and De Souza, 2003). In the current study, we have demonstrated that *R. prolixus* plasmatocytes were also involved in phagocytosis of latex particles and bacteria. Inoculation of these particles into the insect hemocel induced dramatic changes in the relative percentage of plasmatocytes, suggesting that this cell type plays an important role in the cellular immune response.

The increase in relative percentage of plasmatocytes was followed by a considerable decrease in the number of prohemocytes. Previous studies have demonstrated that prohemocytes are located in hematopoietic organs and in the hemolymph of several insect species. These cells are considered by some authors as stem cells, from which the other main types differentiate (Yamashita and Iwabuchi, 2001; Ling et al., 2005). Thus, the decrease of prohemocytes and the increase of plasmatocytes observed in our study could be due to the differentiation of prohemocytes into plasmatocytes. In fact, Yamashita and Iwabuchi (2001), following the fate of microcultured *Bombix mori* prohemocytes in vitro, have unequivocally shown that non-dividing prohemocytes differentiated to plasmatocytes and granulocytes.

There are three morphological events described for the engulfment of particles by mammal phagocytic cells: zippering phagocytosis (mediated via Fc receptors), triggering phagocytosis (mediated via complement receptors) and macropinocytosis which is a receptor-independent and actin-dependent process, whereby the cells engulf both the particles and a large volume of extra-cellular fluid (Swanson and Baer, 1995). Our results showed that the phagocytosis of bacteria by *R. prolixus* plasmatocytes primarily occurred by a zippering-type of phagocytosis, while latex beads were ingested by a triggering process. However, long pseudopodia protruding from plasmatocytes were also observed in cells containing phagocytosed latex particles or bacteria, suggesting that engulfment of these particles by macropinocytosis may also occur.

Although different hemocyte receptors involved in the recognition of foreign particles have been reported in other insects, the nature of these molecules in *R. prolixus* is still unknown. The immune response of insects include a group of pattern-recognition receptors (PRRs) that

---

bind to molecular patterns, such as lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan, that are common on microbial surfaces (Lavine and Strand, 2002). Since the immune response is highly conserved among the insect groups, it is probable that phagocytosis of bacteria by *R. prolixus* may also occur by similar recognition mechanisms. On the other hand, abiotic particles do not have any molecular patterns that would be recognized by specific receptors. In this case, it is likely that proteins present in the hemolymph could be adsorbed to the latex surface and act as opsonins, leading to the efficient phagocytosis of these particles by plasmatocytes. Indeed, Freyer and Bayne (1996) demonstrated that the recognition and uptake of latex beads by hemocytes from the snail *Biomphalaria glabrata* were mediated by adsorbed plasma components.

While phagocytosis was the only cellular response observed towards both latex beads and *E. coli*, hemocyte micro-aggregation and melanization were the main cellular responses in *S. aureus*-challenged *R. prolixus*. These data suggest that the two bacteria species elicit different recognition and/or immune effector mechanisms. This differential response towards Gram-positive and Gram-negative bacteria has been also observed in *Spodoptera littoralis* (Costa et al., 2005) and in *Armigeres subalbatus* (Hillyer et al., 2003). Although, at first sight, the mechanism used in the mosquito immune response towards bacteria seems to be dependent on the Gram type, it has been shown that the antibacterial innate immune response by the mosquito *Aedes aegypti* is independent of Gram type and pathogenicity (Hillyer et al., 2004). It was found that all bacteria tested in these studies, were melanized and that melanization seemed to facilitate bacteria phagocytosis. However, we did not find melanized bacteria inside plasmatocytes even at 120 min. post-inoculation. It is possible that phagocytosis of *S. aureus* would be an alternative mechanism to eliminate bacteria that could have escaped from hemolymph melanization. As stated by other studies (Gupta, 1991; Gillespie et al., 1997), our results showed that the two main hemocyte types that perform nodulation are granular cells and plasmatocytes, although we can not rule out the possibility that other hemocyte types, such as oenocytoids, commonly observed close to micro-aggregation sites, could be also involved.

It is known that phagocytosis in mammal cells involves a strong reorganization of cytoskeletal proteins and organelles (Harrison and Grinstein, 2002). In this study we have demonstrated that an immunological challenge elicited dramatic morphological changes in plasmatocytes, adipocytes and oenocytoids of *R. prolixus*. The observed ultrastructural changes suggest that these processes involve numerous cellular transduction steps, being high energy consuming. Consistently, the lack of lipid droplets and the decrease of glycogen particles, with a simultaneous increase in the number of mitochondria in immune-challenged adipohemocytes could indicate that both glycogen and lipids were used as an energy source to accomplish the

---

task performed by these cells, in response to the immune challenge. Because the plasmatocyte is the main cell type endowed in *R. prolixus* phagocytosis, the ultrastructural changes observed in these cells reflect their importance in this process.

In several insect species, such as *Manduca sexta* and *P. includens*, prophenoloxidase (a key enzyme in the melanization process) is found exclusively in oenocytoids and is released into the hemolymph by rupture of these cells (Pech et al., 1994; Jiang et al., 1997). In our study, the existence of electron-lucent vesicles fusing with the plasma membrane in activated oenocytoids suggests that the granule content, probably corresponding to prophenol oxidase, is discharged into the hemolymph by fusion of vesicles with the plasma membrane, rather than by rupture of oenocytoids, leading to melanization of *S. aureus*.

---

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr. Nilma Cintra Leal for the bacterial strains and culture, Raimundo Nazareno Contente Pimentel and Rodrigo Martins for technical assistance. This work was supported by CPqAM/FIOCRUZ.



## REFERENCES

Aderem, A. Underhill, D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annual Reviews of Immunology 17, 593-623.

Allen, L.A.H., Aderem, A., 1996. Mechanism of phagocytosis . Current Opinion in Immunology 8, 36-40.

Azambuja, P., Garcia, E., 2005. *Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus*. A mini review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 100, 567-572.

Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L., Hoffmann, D., 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. Developmental Comparative Immunology 23, 329-344.

Costa, S.C.P., Ribeiro, C., Girard, P-A., Zumbihl, R., Brehélin, M., 2005. Modes of phagocytosis of Gram-positive and Gram-negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes. Journal of Insect Physiology 51, 39-46.

Fadock, V.A., Chimini, G., 2001. The phagocytosis of apoptotic cells. Seminars in Immunology 13, 365-372.

Fryer, S.E., Bayne C.J., 1996. Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulates in strain specific manner by adsorbed plasma components. Developmental and Comparative Immunology 20, 23-37.

Giulianini, P.G., Bertolo, F., Battistella, S., Amirante, G.A., 2003. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in vivo phagocytosis. Tissue and Cell 35, 243-251.

Gupta, A.P., 1991. Immunology of Insects and Other Arthropods. In: Gupta, A.P., (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL.

---

Harrinson, R.E., Grinstein, S., 2002. Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton. *Biochemistry and Cell Biology* 80, 509-505.

Hillyer, J.F., Schmidt, S.L., Christensen, B.M., 2003. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge. *Cell Tissue Research* 313, 117-127.

Hillyer, J.F., Schmidt, S.L., Christensen, B.M., 2004. The antibacterial innate immune response by the mosquito *Aedes aegypti* is mediated by hemocytes and independent of Gram type and pathogenicity. *Microbes and Infection* 6, 448-459.

Jiang, H., Wang, Y., Ma, C., Kanost M.R., 1997. Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 835-850.

Kurtz, J., 2002. Phagocytosis by invertebrate hemocytes: causes of individual variation in *Panorpa vulgaris* scorpion flies. *Microscopy Research and Techniques* 57, 456-468.

Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemical Molecular Biology* 32, 1295–1309.

Lavine, M.D., Strand, M.R., 2001. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by moth *Pseudauglia inclusens*. *Journal of Insect Physiology* 47, 965-974.

Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R., Kiguchi, K., 2005. Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. *Cell Tissue Research* 320, 535-543.

Ling, E., Yu, X-Q., 2005. Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct function in phagocytosis of foreign particles and self dead cells. *Dev Comp Immunol* 30, 301-309.

---

Oliveira, M.A, De Souza, W., 2003. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. Parasitology International 52, 299-307.

Pech, L.L., Trudeau, D., Strand, M.R., 1994. Separation and behavior in vitro of hemocytes from the moth, *Pseudaletia includens*. Cell and Tissue Research 277, 159-167.

Silverstein, S.C., 1995. Phagocytosis of microbes: insights and prospects. Trends in Cell Biology 5, 141-142.

Swanson, J.A., Baer, S.C., 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. Trends Cell Biol 5, 89-93.

Yamashita, M., Iwabuchi, K., 2001. *Bombix mori* prohemocytes division and differentiation in individual microcultures. Journal of Insect Physiology 47, 325-331.

### LEGEND TO THE FIGURES

**Fig.1-** Transmission electron microscopy of non-challenged *Rhodnius prolixus* hemocytes. **(A)** Prohemocytes showing a high nucleus/cell ratio. The granular cytoplasm contains scarce mitochondria (arrow) and few endoplasmic reticulum profiles (arrowhead). Bar, 1  $\mu\text{m}$ . **(B)** Plasmatocytes showing irregular membrane surface with filopodia protrusions (thin arrow), polymorphic nucleus (N), and several mitochondria widespread in the fine granular cytoplasm (thick arrow). Note the characteristic granules with different electron-densities (\*). Bar, 1  $\mu\text{m}$ . **(C)** Oenocytoid with homogeneous cytoplasm, poor in organelles, containing regular sized electron-dense vesicles close to the plasma membrane (V). Bar, 0.5  $\mu\text{m}$ . **(D)** Adipocytes showing large lipid droplets (L), several small mitochondria (arrow) and cytoplasm filled with glycogen particles (arrowhead). Bar, 1  $\mu\text{m}$ . **(E)** Type I granulocytes showing granules (G) with round to oval appearance, different sizes and electron-density. The cytoplasm presents elongated mitochondria (short arrow), pinocytic vesicles (arrowhead), and endoplasmic reticulum. Plasma membrane ruffles were also observed in this cell type (long arrow). Bar 1  $\mu\text{m}$ . **(F)** High magnification of type II granulocytes showing different granules (G) close to the plasma membrane. Note oval shaped granules with paracrystalline arrangement, with no apparent membrane surround it. Bar, 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 2-** Phagocytosis of latex beads **(A-B)** and *E. coli* **(D-F)** by *Rhodnius prolixus* plasmatocytes. **(A)** Plasmatocytes showing phagosomes containing single or several latex beads (arrow). Some phagosomes, containing several particles, presented an electron-dense matrix (\*). N, nucleus. Bar, 1  $\mu\text{m}$ . **(B)** Detail of latex engulfment by trigger-like phagocytosis. Note the absence of protruding filopodia. Bar, 0.25  $\mu\text{m}$ . **(C)** Phagocytosis of *E. coli* after 30 minutes post-inoculation by zipper-like phagocytosis. A long filopodium (arrow) and membrane ruffles (arrowhead), could be observed in this cell. Bar, 1  $\mu\text{m}$ . **(D)** Detail of phagocytic plasmatocytes after 120 min post inoculation by zipper-like phagocytosis. There is close contact between the phagosome membrane and the particle (arrow). Bacteria at different levels of degradation (\*) and vacuoles containing a number of membranous profiles (arrowhead) were also observed. Bar, 1  $\mu\text{m}$ . **(E)** Initial contact between the bacteria and the nascent filopodium 30 minutes post-inoculation. Bar, 0.5  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 3-** Phagocytosis of *S. aureus* **(A-D)**. **(A)** Hemocyte microagreggate containing type I granulocytes (GR) surrounded by plasmatocytes (PL) with phagocytosed bacteria inside tight

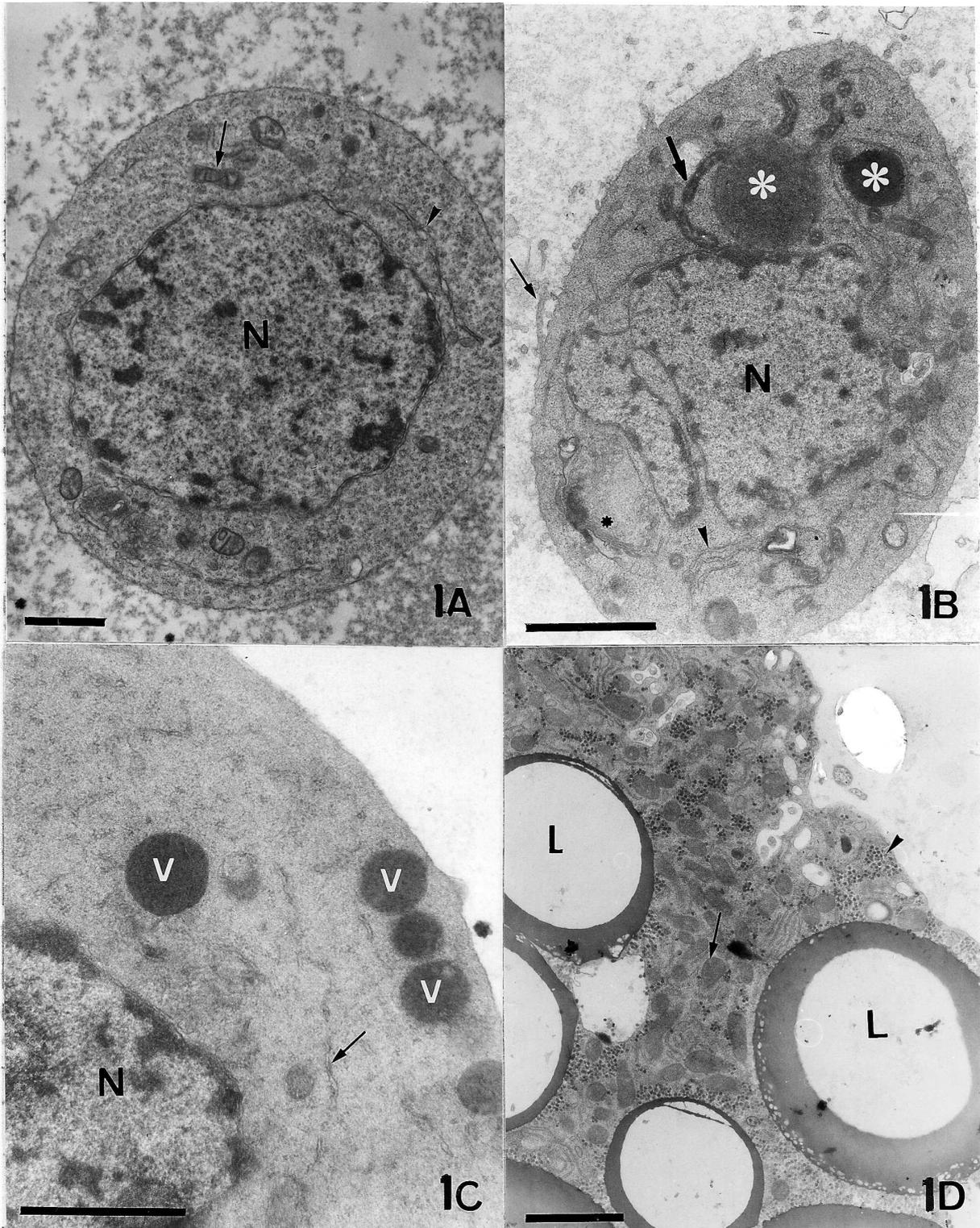
---

phagosomes (arrow), 30 minutes post-inoculation. Bar, 2  $\mu\text{m}$ . **(B)** Melanized *S. aureus* 30 minutes post-inoculation. Bar, 0.5  $\mu\text{m}$ . **(C)** Phagocytosis of unmelanized bacteria 60 minutes post-inoculation. Note the phagosome containing bacterium (\*) and amorphous material. Membrane ruffles (arrowhead) indicative of micropinocytosis could be also observed in this cell. Bar, 0.5  $\mu\text{m}$ . **(D)** Plasmatocytes containing unmelanized bacteria 120 minutes post-inoculation. Only two bacteria could be observed in this cell. Note the higher number of myelin-like structures inside large vacuoles containing amorphous material (arrow).

**Fig. 4-** Morphological changes in hemocytes after immune challenge with bacteria **(A)** Low magnification of activated plasmatocytes containing empty vacuoles (\*), phagocytosed bacteria (long arrow), cluster of mitochondria inside large vacuoles (short arrow), multivesicular bodies (arrowhead) and a number of picnocyctic vesicles. Bar, 1  $\mu\text{m}$ . **(B)** Detail of plasmatocytes showing euchromatic nucleus (N) and cluster of mitochondria (M). GC, Golgi complex. Bar 1  $\mu\text{m}$ . **(C)** Activated adipocytes showing empty electron-lucent space in the cytoplasm (\*), increase of mitochondria (arrow) and decrease of glycogen granules. N, nucleus. Bar, 2  $\mu\text{m}$ . **(D)** Activated oenocytoids showing electron-lucent vesicles (Ve) fusing with the plasma membrane (arrowhead). N, nucleus. Bar, 1  $\mu\text{m}$ .

---

Fig.1



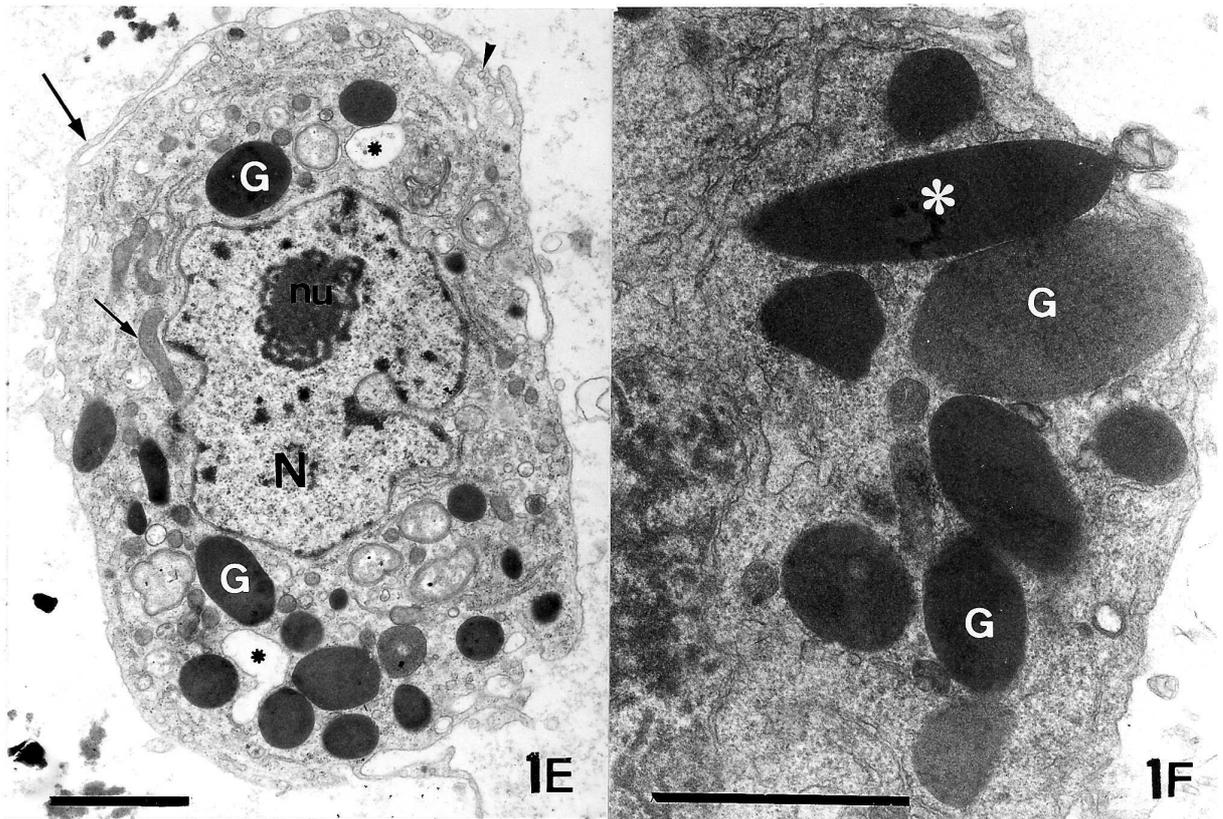


Fig.2

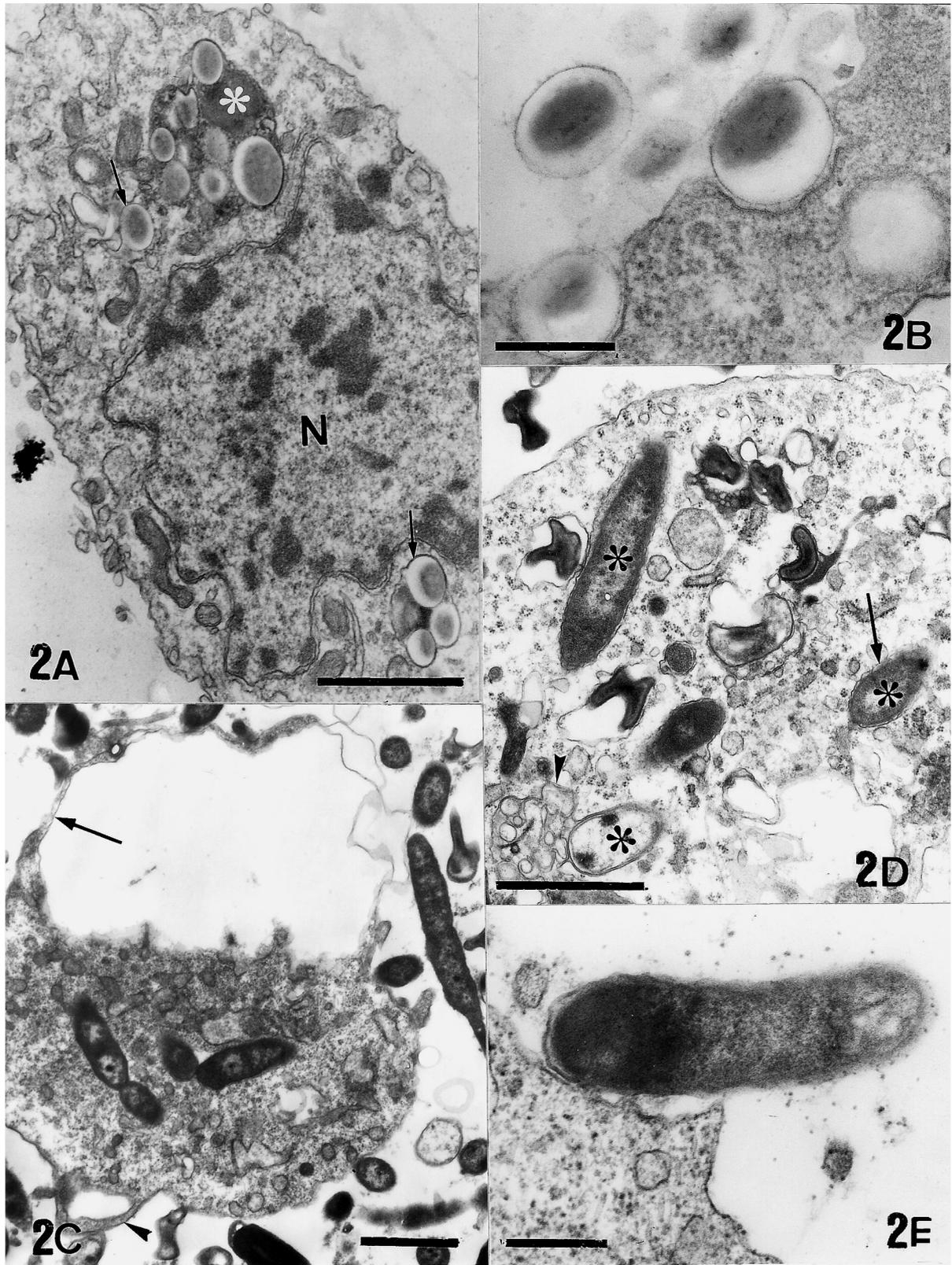


Fig. 3

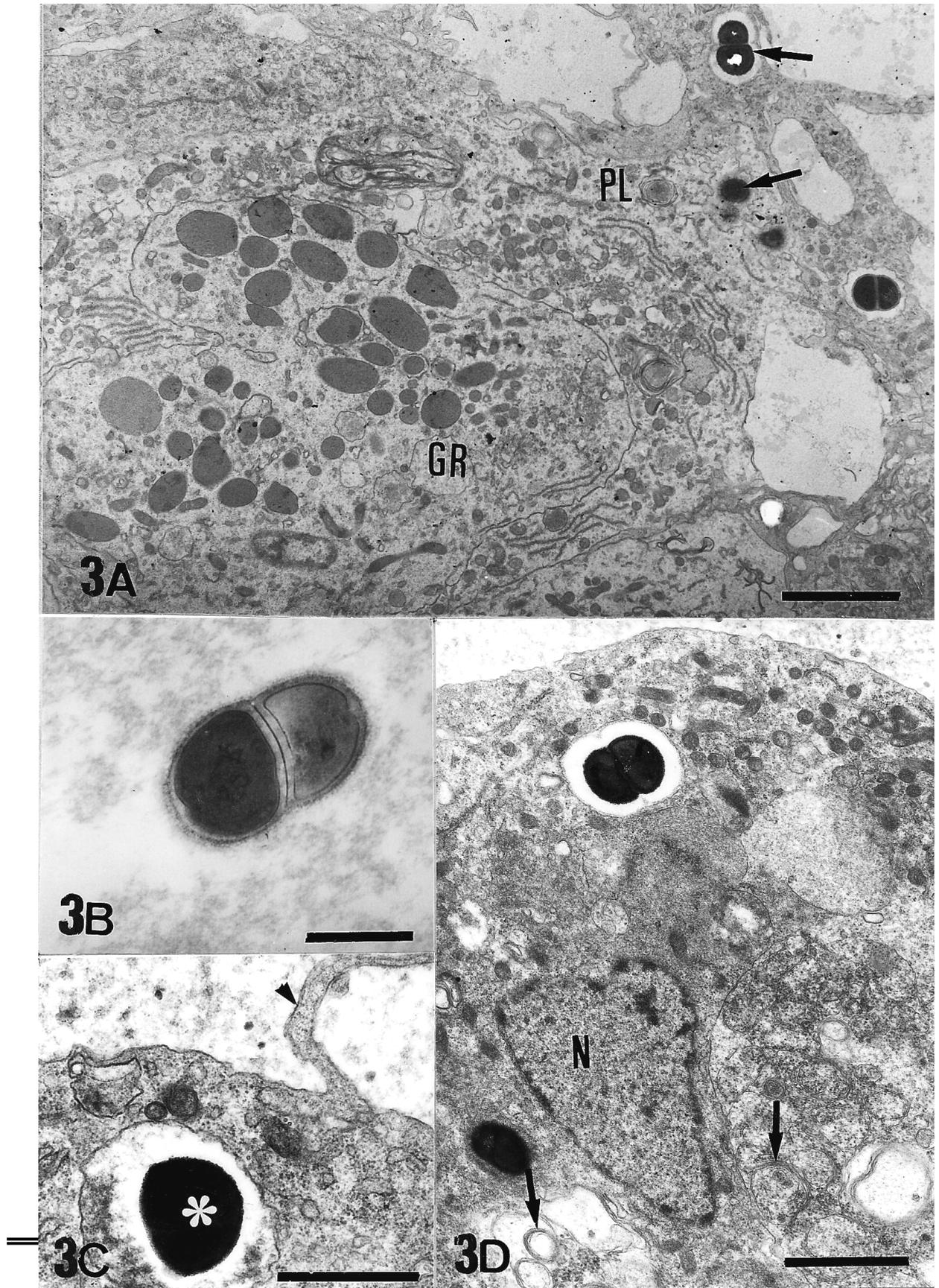
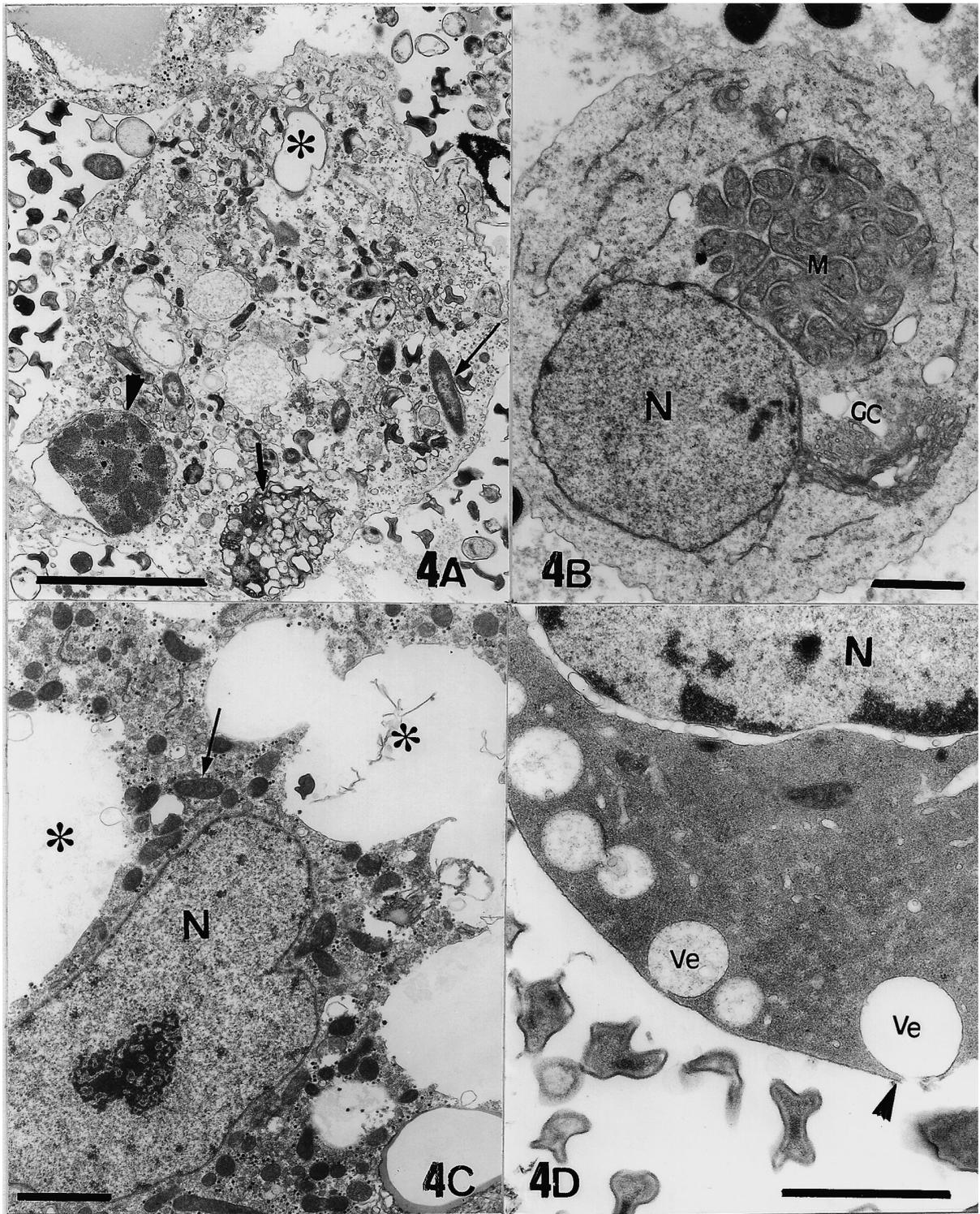


Fig..4



---

relative % of hemocytes types

---

Hemocyte	Non-inoculated insects	Latex beads			<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
		30 min.	60 min	120 min.	30 min	60 min.	120 min	30 min	60 min	120 min
PH	40,2	9,0	7,1	7,6	12,8	11,0	17,6	14,0	12,8	13,8
PL	49,5	65,0	72,6	66,5	73,0	79,6	74,8	69,7	76,0	75,0
GR	3,0	11,0	12,6	16,0	4,8	2,1	3,4	7,3	3,0	3,5
OE	5,3	7,0	3,7	5,3	6,3	4,4	2,0	5,6	3,0	3,7
AD	2,0	9,0	4,0	4,6	3,1	2,9	2,2	3,4	5,2	4,0

---

---