

A1-242 El papel de los granulocitos en la respuesta inmune de las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae): encapsulación hemocítica.

Pérez Kepp, Olivia. Universidad Bolivariana de Venezuela E-mail: olisofpk@gmail.com.

Resumen

Con el fin de establecer una correlación entre estructura y función de los granulocitos (GRs) sanguíneos en las reacciones de defensa interna de las larvas de *Spodoptera frugiperda*, la hemolinfa fue sometida a técnicas de microscopía óptica (Giemsa) e histoquímicas (dopa-oxidasa), microscopía de contraste de fase (MCF) y microscopía electrónica. Ultraestructuralmente, los GRs mostraron gránulos (grs) semejantes a los melanosomas y premelanosomas de vertebrados. En microscopía óptica, el citoplasma de los GRs se observó vacuolizado y desprovistos de grs. En MCF, los GRs liberaron sus grs con actividad dopa-oxida al plasma, causando la melanización y coagulación de la hemolinfa lo que sugiere que los grs son organelos, análogos en estructura y función a los premelanosomas y melanosomas de vertebrados. El conocimiento de los mecanismos de inmunidad natural permitirá planificar el empleo de parasitoides y microorganismos entomopatógenos en el Manejo Agroecológico de Insectos "Plagas".

Palabras claves: dopa- oxidasa; hemocitos; hemolinfa; melanina.

Abstract

In order to establish a correlation between structure and function of blood granulocytes (GRs) in the interne defense reactions of *Spodoptera frugiperda*, the hemolymph was subjected to optical microscopy (Giemsa) and histochemical (dopa-oxidase), phase contrast microscopy (PCM) and electron microscopy. Ultrastructurally, GRs showed granules (grs) similar to the vertebrate melanosomes and premelanosomes. In optical microscopy, the cytoplasm of GRs was revealed vacuolated and devoid of grs. In PCM, the GRs released their grs dopa oxidase activity to the plasma, causing melanization and coagulation of the hemolymph suggesting that the grs are organelles, similar in structure and function to vertebrate premelanosomes and melanosomes. Knowledge of the mechanisms of natural immunity allow to plan the use of parasitoids and entomopathogenic microorganisms in Agroecological Management of Insect Pest Programs.

Keywords: dopa- oxidase; hemocytes; hemolymph; melanin.

Introducción

Sobre *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), plaga económicamente importante en Venezuela, actúan en condiciones naturales gran cantidad de insectos parasitoides y microorganismos entomopatógenos que podrían ser utilizados como agentes de control biológico (Pérez Kepp 2002). Los mecanismos de defensa interna (respuesta inmune) que pueda esgrimir este lepidóptero producto de su interacción con sus potenciales agentes de control han sido poco estudiados. En general, los insectos tienen un mecanismo primario en contra de sus endoparásitos metazoarios y consiste en una reacción hemocítica que conduce a la formación de una cápsula pigmentada alrededor del parasitoide (Salt, 1968), la cual tiene un valor protectivo muy importante para el insecto hospedero. Un parásito con éxito, además de ser capaz de utilizar al hospedero como un medio de nutrición en el cual desarrollarse debe poseer algún mecanismo para evitar la reacción de defensa del insecto (Negreiro et al. 2004). Estudios anteriores sobre los mecanismos de defensa interna de las larvas de *S. frugiperda* contra el parásito *Eiphosoma vitticolle* (Hymenoptera: Ichneumonidae) mostraron que la melanización y encapsulación hemocítica del huevo del

parasitoide era una estrategia destinada a evitar su desarrollo (Pérez Kepp y Campo- Aasen 1985). En lepidópteros, los granulocitos (GRs) son los hemocitos que han sido mayormente observados participando en los procesos de encapsulación (Ratcliffe y Rowley 1979). El objetivo de esta investigación fue establecer una correlación entre estructura y función, morfología funcional, de los GRs sanguíneos de las larvas de *S. frugiperda*, mediante Microscopía de Luz, Microscopía de Contraste de Fase y Microscopía Electrónica de Transmisión que permitiera visualizar la participación de estos hemocitos en la coagulación y melanización de la hemolinfa y encapsulación hemocítica de parásitos metazoos como procesos de defensa interna. Conocer los mecanismos de la respuesta inmune de los insectos hospederos y mecanismos de evasión de esta respuesta por parte de los agentes de control biológico constituye una herramienta importante que debe ser utilizada como parámetro fisiológico y como referencia para obtener perfiles de defensa para programar el empleo de los parasitoides, microorganismos entomopatógenos y otros parásitos en los programas de manejo agroecológico de los insectos plaga.

Metodología

Se utilizaron larvas de 24 horas después de haber mudado al VI instar. *Estudios de Microscopía Óptica (MO)*: la identificación de los tipos de hemocitos en la hemolinfa de *Spodoptera* se realizó utilizando la coloración de frotis de hemolinfa (Técnica de Giemsa Completa, Arnold y Hinks 1979); el reconocimiento de los hemocitos se hizo de acuerdo a lo señalado por Arnold (1982). *Estudios de Histoquímica*: se determinó la actividad de la enzima Dopa Oxidasa (Pearse 1972). *Estudios de Microscopía de Contraste de Fase (MCF)*: se utilizó la Técnica de Hemolinfa de Gota Colgante (Gupta 1979); la muestra de hemolinfa fue observada por un tiempo máximo de 8 a 10 min. *Estudios de Microscopía Electrónica de Transmisión*: se modificaron técnicas utilizadas rutinariamente en el Laboratorio de Histoquímica y Citoquímica del Instituto de Biomedicina (Caracas) para células aisladas de vertebrados y microparásitos humanos a fin de adaptarlas para la hemolinfa de insectos y a nuestras condiciones de estudio; la adaptación consistió en la agregación, omisión y/o el reemplazo de pasos y/o reactivos (Pérez Kepp 1992).

Resultados y discusiones

En las preparaciones de hemolinfa teñidas con Giemsa (Figura 1), la mayoría de los GRs mostraron un citoplasma vacuolado y sin grs, sin embargo, en algunos de estos hemocitos se pudo visualizar la variedad en el tamaño y en la afinidad de los grs por el colorante (cabezales de flechas); la hemolinfa en el espacio pericelular se observó coagulada. Ultraestructuralmente (Figura 2), los GRs, mostraron las características típica de las células secretoras, con una variedad de gránulos; en insectos, la característica típica y diferencial de los GRs es poseer numerosos grs ultraestructuralmente diferentes a los lisosomas (L) (Ennesser y Nappi, 1984).

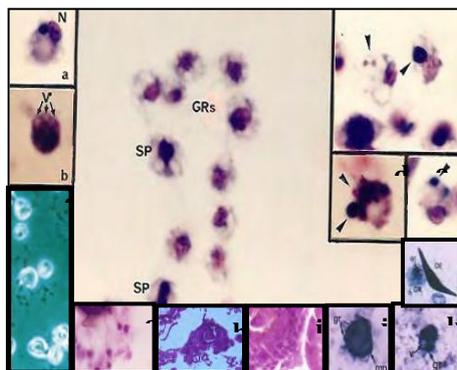


FIGURA 1. Característica de los GRs en Microscopía Óptica, Microscopía de Contraste de Fase, dopa-oxidasa, Proceso de Encapsulación Hemocítica.

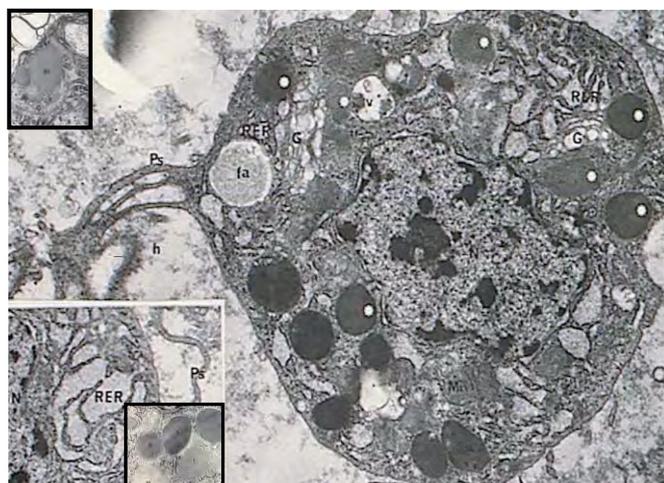


FIGURA 2. Caracterización ultraestructural de los GRs.

En *S. frugiperda*, la mayoría de los grs citoplasmáticos (Figura 2), asteriscos blancos en figura central y gr 1, 2, 3, en recuadros), presentaron subestructura microtubular típica junto a una matriz intratubular variable en densidad, similares a los premelanosomas de vertebrados. Junto a éstos, otros grs, considerados maduros, mostraron un material fino, homogéneo y electrondenso similares a los melanosomas de vertebrados. La presencia de estos dos tipos de estructura en los grs parece ser una característica propia de los GRs en lepidoptera (Ennesser y Nappi 1984).

El hecho de que los hemocitos en los insectos están envueltos en la producción de melanina, permitió a Taylor (1969) sugerir que los grs en los GRs son organelos análogos en estructura y función a los premelanosomas de vertebrados; la posible participación de los hemocitos en la encapsulación hemocítica fue planteada por Hagopian (1971) por los antecedentes que existen sobre la determinación química de Tirosinasa y Dopa- oxidasa en los hemocitos de ciertos insectos y la melanización de materiales encapsulados. La posible analogía y desarrollo entre los grs de los GRs de *S. frugiperda* y los premelanosomas de vertebrados no necesariamente indica una analogía funcional. Esta última se evidencia con la determinación de Tirosinasa y/o Dopa- oxidasa en los grs de los GRs, debido a que ambas enzimas son consideradas marcadores de los melanosomas (Ratcliffe y Rowley 1979). En este trabajo

se observó la presencia de Dopa- oxidasa en los hemocitos de *S. frugiperda* (Figura 1, Dopa), particularmente en los OEs, GRs y SPs. En los GRs, el producto de la reacción enzimática fue particularmente intenso hacia la membrana plasmática (mp) y en uno a varios grs grandes. El plasma de la hemolinfa (h), generalmente coagulada alrededor de los GRs, presentó actividad enzimática de variable intensidad. La presencia de grs positivos a Dopa-oxidasa en los GRs de las larvas de *S. frugiperda*, confirma que estas células pueden participar en la producción de melanina. En las preparaciones frescas de MCF (Recuadro, Figura 1), los GRs, inmersos en un plasma cristalino mostraron un citoplasma hialino con zonas oscuras en forma de grs. A cinco minutos de observación, los GRs emitieron filopodias y a través de movimientos ameboidales se desplazaron y agregaron, expulsando hacia el plasma sustancias oscuras semejantes en pigmentación a los grs (cabezas de flechas). Como resultado de la expulsión de estas sustancias, el plasma de la hemolinfa oscureció y coaguló; a este tiempo, llamó la atención el movimiento de desplazamiento de los PLs. Entre 6 a 8 minutos de observación, las diferentes categorías de hemocitos estaban agregadas y el plasma completamente turbio por la gran cantidad de restos celulares y grs pigmentados (Figura 1). En las larvas del VI instar de *S. frugiperda*, la coagulación de la hemolinfa apreciada en los estudios de microscopía óptica y de MCF, indica que ésta es una reacción promovida por la secreción de los GRs. En opinión de Ratcliffe y Rowley (1979), la liberación rápida de los grs no estructurados por los GRs en los procesos de reparación de heridas, nodulación y encapsulación en *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Noctuidae) causó el inicio de la coagulación de la hemolinfa circundante a estos hemocitos con la formación de una matriz acelular- melanizada la cual fue encapsulada por los PLs. Según estos autores, en lepidópteros, salvo ligeras modificaciones, todas las reacciones de defensa (reparación de heridas, fagocitosis, nodulación y encapsulación) se llevan a cabo en una forma bastante similar.

En estudios anteriores, Pérez-Kepp y Campo- Aasen (1985) mostraron la dinámica del proceso de encapsulación del parasitoide *E. vitticolle* en larvas de *S. frugiperda* (Figura 1, recuadros). A los 5 minutos después de la infestación experimental se observó el corión del huevo melanizado. Transcurrido 24 horas, los GRs fueron vistos sumergidos en una matriz compuesta de fibras y plasma gelificado, envolviendo el huevo del parásito. Los GRs no mostraron grs citoplasmáticos sino grandes vacuolas conteniendo un material eosinofílico de naturaleza fibrilar similar al de la matriz extracelular (hemolinfa coagulada). Los GRs en contacto con el corión del huevo del parasitoide, no se observaron en proceso de lisis. A las 48 horas, los huevos del parasitoide estaban envueltos por una cápsula hemocítica compuesta por varias capas de PLs achatados. La melanización de la superficie del corión, podría explicarse por la movilización y desgranulación de los GRs observadas en las preparaciones de MCF y la demostración histoquímica de Dopa- oxidasa en los grs de estos hemocitos. De los resultados obtenidos en esta investigación y aquellos observados en el proceso de encapsulación hemocítica del huevo del parasitoide *E. vitticolle* en larvas de *S. frugiperda* se desprende que la encapsulación en este lepidóptero ocurre de manera similar a *G. mellonella*, en dos fases, donde los GRs inician la coagulación de la hemolinfa y la melanización del corión del huevo del parasitoide y posteriormente, los PLs atraídos por la liberación de fenoloxidasas (actuando como opsoninas) se distribuirían en capas delimitando la cápsula.

Los hemocitos constituyen la barrera final del sistema de defensa inmune de los insectos contra las infecciones e infestaciones por parásitos; el éxito de la respuesta inmune depende del papel de los hemocitos. Para que la parasitación sea exitosa, los agentes de control deben superar la respuesta inmune de sus hospederos; estas reacciones de evasión son consideradas las bases principales para el desenvolvimiento de un agente de control. Conocer los mecanismos de la respuesta inmune de los insectos hospederos y mecanismos

de evasión de esta respuesta por parte de los agentes de control biológico, producto de la interacción parásito- hospedero como proceso dinámico de constante coevolución, constituye una herramienta importante que debe ser utilizada como parámetro fisiológico y como referencia para obtener perfiles de defensa para programar el empleo de los parasitoides, microorganismos entomopatógenos y otros parásitos en los programas de manejo agroecológico de los insectos plaga. Es factible pensar en “modificar” las reacciones de defensa de los insectos “plagas”, en nuestro caso de interés agrícola, a fin de que los agentes ejerciendo control biológico, además de lograr completar su ciclo de vida en estos hospederos incrementen la efectividad de su acción.

Conclusiones

Los granulocitos (GRs) de las larvas de *S. frugiperda*, presentan dos tipos de gránulos (grs) semejantes a los melanosomas y premelanosomas de vertebrados. La presencia de grs positivos a Dopa- oxidasa en estos hemocitos comprueba que la descarga rápida de material granular está asociada con la liberación de fenoloxidasas y la coagulación- melanización de la hemolinfa en el insecto y en consecuencia confirma que los gránulos en los GRs en *S. frugiperda* son organelos, similares en estructura y análogos en función a los premelanosomas y melanosomas de vertebrados. De forma similar a otros lepidópteros, la liberación local de los grs podría considerarse la etapa inicial de los procesos de defensa en el insecto. En este sentido, el proceso de encapsulación en *S. frugiperda*, podría ocurrir en dos fases donde los GRs inicien la coagulación de la hemolinfa y la melanización del corión del huevo del parasitoide y posteriormente, los PLs se distribuirían en capas delimitando la cápsula.

Agradecimientos

A la Dra. María Suleima González del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-Aragua; al Laboratorio de Histoquímica y Citoquímica del Instituto de Biomedicina (Caracas).

Referencias bibliográficas

- Arnold J W (1982) Larval hemocytes in Noctuidae (Insecta: Lepidoptera). *International Journal of Insect Morphology. & Embryology*, 11(3/4): 173-188.
- Arnold JW & C Hinks (1979) Insect hemocytes under lightmicrocopy: techniques. In: Gupta, PA., ed. *Insect Hemocytes; development, forms, function and techniques*. Cambridge, Cambridge University Press. pp 531- 538.
- Crossley A (1979) Biochemical and ultrastructural aspects of synthesis, storage and secretion in hemocytes. In: Gupta AP ed, *Insect Hemocytes; development, forms, function and techniques*. Cambridge, Cambridge University Press. pp. 423- 473
- Ennesser C & Nappi A (1984) Ultrastructural of the encapsulation response of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Ultras. Res*, 87(1):31-45.
- Gupta AP (1979) Identification key for hemocytes types in hanging-drop preparations. In: Gupta, PA., ed. *Insect Hemocytes; development, forms, function and techniques*. Cambridge, Cambridge University Press. pp. 527-529.
- Hagopian M (1971) Unique structures in the insect granular hemocytes. *Journal of Ultrastructure Research*, 6(4/5): 647-658.
- Negreiro MC, FG Andrade & AM Falleiros (2004) Sistema inmunológico de defensa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), AgMNPV- resistant. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 25 (4): 293- 308.
- Pearse E (1972) *Histoquímica; theoretical and applied*. 3 ed. London, Churchill Livingstone. 2v.
- Pérez Kepp O (1992) Caracterización morfológica, ultraestructural y citoquímica de los hemocitos de larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), Tesis de Doctorado. Maracay: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 330 p.



- Pérez Kepp O (2002) Control microbiano de insectos plagas en los agroecosistemas de la Cuenca del Lago de Valencia como una medida alternativa al uso de insecticidas químico: Diagnóstico de las enfermedades por entomopatógenos en cultivos de maíz del estado Aragua, Pasantía Posdoctoral. Maracay: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 174 p.
- Pérez Kepp O & I Campo-Aasen (1985) Mecanismos de defensa de las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) en contra del desarrollo del parasitoide *Eiphosoma* (Hymenoptera: Ichneumonidae). I. Formación de la cápsula hemocítica. Acta Científica Venezolana, 35: 10.
- Ratcliffe N & A Rowley (1979) Role of hemocytes in defense against biological agents In: Gupta, PA., ed. Insect Hemocytes; development, forms, function and techniques. Cambridge, Cambridge University Press. pp 331- 414.
- Salt G (1968) The resistance of insect parasitoids to the defense reactions of their host. Biochemistry Reviv, 43:200- 232.
- Taylor R (1969) A suggested role for polifenol- oxidase system in invertebrate immunity. Journal of Invertebrate Pathology, 14:427-428.