

UTILIZAÇÃO DE OVOS DE *Deois flavopicta* (STAL, 1854) (HOMOPTERA: CERCOPIDAE) NO PREPARO DE ANTISSOROS ESPECÍFICOS¹

Carlos R. Sousa-Silva²

Avelino R. Oliveira³

Josué M. Pacheco²

ABSTRACT

Utilization of *Deois flavopicta* eggs (Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae) for the preparation of the specific antiserum

This research aimed to develop and test serology on *Deois flavopicta* (Stal, 1854).

For the preparation of the specific antiserum, rabbits were immunized by the "lymphonodule" injection method with antigens obtained from *D. flavopicta* eggs under the following conditions: newly oviposited or up to two days old eggs; diapausing eggs, older than 30 days; and eggs with cap or with a mean of 15 days.

Specific serological reactions were obtained after the first antigen inoculation.

The antiserum for newly laid eggs (AS-R) was more sensible than antiserum for diapausing eggs (AS-D) and this was more sensible than antiserum for eggs with cap (AS-O).

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo utilizar ovos de *Deois flavopicta* (Stal, 1854) no preparo de antissoros específicos.

Recebido em 03/11/87

¹ Trabalho realizado com financiamento parcial da EMBRAPA.

² Departamento de Ciências Biológicas - UFSCar - Cx. Postal 384, 13560 São Carlos, SP.

³ Instituto de Biologia - UNICAMP - Campinas, SP.

Coelhos foram imunizados pela técnica de injeção no linfonódulo com antígenos obtidos de ovos de *D. flavopicta*, nas seguintes fases de desenvolvimento: recém-ovipositados (no máximo com dois dias de idade); em diapausa (com mais de trinta dias de idade) e com opérculo (em média com quinze dias de idade).

As reações serológicas com os antissoros obtidos mostraram que após uma única injeção de antígeno já foi possível de tectar-se reações específicas.

O antissoro para ovos recém-ovipositados (AS-R) mostrou maior poder de resolução de linhas do que aquele para ovos em diapausa (AS-D) e este, maior que o antissoro para ovos com opérculo (AS-O).

INTRODUÇÃO

Antissoros de insetos têm sido obtidos, na maioria das vezes, empregando-se como antígenos imunizantes as fases pós-embrionárias das espécies a serem investigadas.

TLEFER (1954) empregou a serologia para caracterizar os mecanismos celulares responsáveis pelos processos de metamorfoses em *Platysamia cecropia* (Lepidoptera: Saturniidae) e, utilizou como antígeno imunizante, além da hemolinfa do inseto em vários estágios de desenvolvimento, ovos não fertilizados.

Neste trabalho procurou-se desenvolver e testar o uso de serologia em *Deois flavopicta* (Stal, 1854) utilizando a fase de ovo deste inseto, como antígeno imunizante, no preparo de antissoros específicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ovos de *D. flavopicta* nos seguintes estágios de desenvolvimento: recém-ovipositados (R), até dois dias de idade; em diapausa (D), com mais de trinta dias e com opérculo (O), em média com quinze dias de idade, obtidos em laboratório através de posturas realizadas por fêmeas coletadas no campo seguindo-se a metodologia descrita por PACHECO (1981).

A metodologia empregada no preparo dos antígenos e dos antissoros foi aquela descrita por SOUSA-SILVA (1985).

Preparo dos Antígenos (AG)

Ovos recém-ovipositados e ovos com opérculo foram macerados em presença de solução de NaCl 0,85% (13,00 mg de ovos/0,5 ml da solução). Os macerados foram deixados em repouso por 5 minutos. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes, emulsionados com adjuvante Freund incompleto (V/V) foram utilizados como antígenos R (AG-R) e D(AG-D).

Os ovos em diapausa foram macerados diretamente em adjuvante Freund incompleto (7,0 mg de ovos/0,7 ml de adjuvante) e utilizados como antígeno O (AG-O).

Preparo dos Antissoros (AS)

Três coelhos pesando em média 2,5 kg foram, respectivamente, inoculados com duas doses de 0,5 ml de cada um dos antígenos R, D e O, observando-se um intervalo de quinze dias entre a primeira e a segunda dose. Foi utilizada a técnica de injeção próxima à região do linfonóculo (OLIVEIRA, 1975) para a imunização dos coelhos.

Sangrias e Conservação dos Antissoros

Antes da injeção de antígenos recolheu-se, de cada coelho, uma amostra de sangue para obtenção do soro normal (SN) utilizado como controle nas reações serológicas. Durante o período de imunização fez-se sangrias diárias, por trinta dias consecutivos. O sangue, em média 10 ml por sangria, era recolhido em um frasco através de um pequeno corte longitudinal feito na veia marginal da orelha do coelho e permanecia por 2-3h em temperatura ambiente. O coágulo formado era deslocado das paredes do frasco e mantido em geladeira (10 °C) por 24h. O soro obtido era adicionado de mertiolato, numa concentração final de 1/10000 e armazenado em congelador (-2°C).

Testes Serológicos e Titulação dos Antissoros

Para os testes serológicos utilizou-se a técnica de dupla difusão em gel de ágar a 1% (OUCHTERLONY, 1958) em tampão PBS, 0,01M, pH 7,0 (HÖFLING, 1975), sobre lâminas de microscópio (3,0 ml da solução de ágar por lâmina de 75x25mm).

Os antissoros foram testados contra seus antígenos homólogos: AG-R, AG-D e AG-O.

Para a titulação os antissoros foram diluídos em NaCl 0,85%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O título do AS-R foi de 1/4.

As reações entre o AS-R, obtido treze dias após o início

do processo de imunização do coelho e o antígeno homólogo (AG-R) foram positivas, tendo-se verificado uma linha de precipitação. Dezesete dias após, verificaram-se duas linhas e, dezoito dias após, quatro linhas.

O título do AS-D foi de 1/4.

Resultados positivos entre este antissoro e seu antígeno homólogo (AG-D) foram observados quinze dias após a primeira injeção antigênica no coelho, tendo-se observado duas linhas de precipitação. Vinte dias após observaram-se três linhas e, vinte e quatro dias após, quatro.

O título do AS-O foi de 1/8.

As reações do AS-O com o antígeno homólogo (AG-O) mostram resultados positivos dez dias após o início do processo de imunização do coelho, tendo-se verificado duas linhas de precipitação. Dezoito dias após foram observadas quatro linhas (Quadro 1).

Os testes serológicos com os AS-R, AS-D e AS-O mostram que após uma única injeção de antígeno na região do linfonóduo do coelho é possível detectar reações específicas.

QUADRO 1 - Linhas de precipitação observadas em testes serológicos de dupla difusão em ágar entre cada um dos antígenos obtidos de ovos recém-ovipositados (AG-R), ovos em diapausa (AG-D) e ovos com opérculo (AG-O) de *Deois flavopicta* e seus antissoros específicos, respectivamente, AS-R, AS-D e AS-O.

Antígenos	Antissoros	Número de linhas de precipitação observadas nas reações serológicas
AG-R	AS-R (13 ^a)	1
	AS-R (17 ^a)	2
	AS-R (18 ^a)	4
AG-D	AS-D (15 ^a)	2
	AS-D (20 ^a)	3
	AS-D (24 ^a)	4
AG-O	AS-O (10 ^a)	2
	AS-O (18 ^a)	4

numeros entre parênteses = ordem de sangria após a 1^a injeção de antígeno no coelho.

Comparando-se os antissoros entre si, observa-se que todos eles discriminam no máximo 4 linhas de precipitação. Essas linhas porém, são mais nítidas nas reações com o AS-R, sendo o AS-O o de menor poder de resolução, como pode ser visto nas reações desses antissoros com o antígeno para ovos com opérculo (Figura 1). Esses resultados podem ser conseqüência do estágio de desenvolvimento do ovo utilizado como antígeno imunizante. EBERT (1970) cita que no processo de desenvolvimento do embrião ocorre uma seqüência ordenada de transformações, resultando num aumento do grau de complexidade e que poderia ser traduzido pela diminuição da sua capacidade ou pelo aparecimento de novas propriedades bioquímicas ou estruturais. Nesse caso, o ovo recém-ovipositado, pela sua menor diferenciação, poderia proporcionar antissoros com maior poder de resolução de linhas do que aqueles obtidos de ovos em diapausa e ovos com opérculo.

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Ovos de *D. flavopicta* podem ser utilizados como antígeno no preparo de antissoros específicos.

2. Com a técnica de injeção no linfonódulo do coelho é possível detectar-se reações específicas para ovos com opérculo, dez dias após uma única injeção do antígeno; treze dias após para ovos recém-ovipositados e quinze dias após para ovos em diapausa.

3. A fase de desenvolvimento do ovo de *D. flavopicta* utilizada como antígeno imunizante influi no poder de resolução do antissoros obtido.

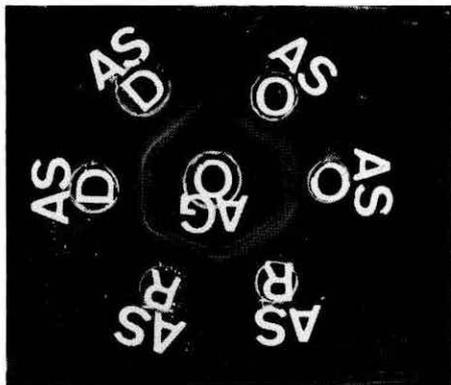


FIGURA 1 - Reação serológica de dupla difusão em ágar entre os AS-R, AS-D e AS-O e o antígeno para ovos com opérculo (AG-O).

LITERATURA CITADA

- EBERT, J.D. *Mecanismos no desenvolvimento*. Enio Matheus Guazelli & Cia. Ltda., 1970. 273p.
- HÖFLING, J.F. Reações serológicas com antígenos presentes em sementes de *C. arabica* L. Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP, 1975. 45p. *Tese de Mestrado*.
- OLIVEIRA, A. R. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de injeção do antígeno no linfonóculo. *Summa Phytopatologica* 1: 61-64, 1975.
- OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. In: S. Karger ed., *Progress in Allergy*. Basel, New York, 1958, v. 5, 78p.
- PACHECO, J.M. *Aspectos da Biologia e Ecologia de Deois (Acanthodeois) flavopicta (Stal, 1854) (Homoptera, Cercopidae) na região de São Carlos, São Paulo, Brasil*. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, SP, 1981. 111p. (*Tese de Doutorado*).
- SOUSA-SILVA. C.R. *Serologia aplicada ao estudo de Deois flavopicta (Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae)*. Piracicaba. ESALQ-USP, 1985. 99p. (*Tese de Doutorado*).
- TELFER, W.H. Immunological studies of insect metamorphosis. II. The role of a sex-limited blood protein in egg formation by the *Cecropia* silkworm. *J. gen. Physiol.* (37):539-558, 1954.