

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

**CULTIVO PRIMÁRIO DA GLÂNDULA SALIVAR, CANAL SALIVAR E
INTESTINO MÉDIO ANTERIOR DE TRIATOMÍNEOS (HEMIPTERA,
REDUVIIDAE) PARA O ESTUDO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS
RELACIONADAS COM A HEMATOFAGIA**

FERNANDA FARIA ROCHA

BELO HORIZONTE
2010

Fernanda Faria Rocha

**CULTIVO PRIMÁRIO DA GLÂNDULA SALIVAR, CANAL SALIVAR E
INTESTINO MÉDIO ANTERIOR DE TRIATOMÍNEOS (HEMIPTERA,
REDUVIIDAE) PARA O ESTUDO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS
RELACIONADAS COM A HEMATOFAGIA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientador: Dr. Marcos Horácio Pereira (UFMG)

Co-orientador: Dr. Nelder F. Gontijo (UFMG)

Colaboradores: Dr. Luciana M. Silva (FUNED),
Dr. Ricardo N. Araújo (UFMG)

Belo Horizonte
2010

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores e amigos de laboratório que me fizeram entender, cotidianamente, o valor e o sentido da pesquisa científica.

AGRADECIMENTOS

- Meu agradecimento maior é a Deus, propiciador de tudo e fonte do amor infinito, por estar sempre ao meu lado me dando força, esperança, coragem, determinação e certeza de que meus sonhos são possíveis.
- Aos meus pais (Nilson e Marise), pelo amor, força e apoio incondicionais em todos os meus projetos de vida.
- Ao meu irmão (Fábio) e cunhada (Cíntia), pelo grande carinho e torcida.
- Ao meu orientador Marcos Horácio Pereira, pela oportunidade, orientação, paciência, atenção e apoio.
- Ao meu co-orientador Nelder de Figueiredo Gontijo pelas idéias, boa vontade e bom humor.
- Aos colaboradores deste projeto, Luciana Maria Silva e Ricardo Nascimento Araújo, por se fazerem presentes durante todas as fases do projeto, além de toda atenção, paciência, idéias e amizade para comigo.
- Aos amigos de laboratório (LFIH e LBCIBT) pelo auxílio, companheirismo, apoio, paciência, compreensão.
- Aos meus amigos de sala da pós-graduação, que tornaram o curso muito agradável ao longo destes 2 anos.
- Ao meus amigos de Itaúna - Jordi, Lu, Dani, Eltinho, Risa, Elisangela - e de BH – Jousie, Dani, Bianca, Nathalie, Marcinha - pelo carinho e compreensão pela minha ausência nesses últimos tempos.
- Aos meus amigos novos Paty Nanda, Isabella Leite, Cíntia, Camila, Rodrigo, Laila, Jéssica, Isabela Gomes e Rebeca pelo carinho, companheirismo e momentos de descontração vivenciados ao longo do último ano de mestrado.

- Ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia ICB/UFMG.
- A Fapemig, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais) e no Laboratório de Biologia Celular e Inovações Biotecnológicas (Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento – Fundação Ezequiel Dias).

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”.

John Ruskin

RESUMO

Triatomíneos são insetos hematófagos vetores do *Trypanosoma rangeli* e do *T. cruzi*. A capacidade vetorial dos triatomíneos em hospedeiro humano está diretamente relacionada à sua performance alimentar. O objetivo deste trabalho foi obter e padronizar cultivo primário de glândula salivar, canal salivar e intestino médio anterior de triatomíneos para o estudo de moléculas bioativas relacionadas com a hematofagia. As células de glândula salivar de *Rhodnius prolixus* permaneceram viáveis em cultura por 30 dias. Três tipos de células foram identificados nas culturas de glândula salivar ao MO: o tipo I com células alongadas e fusiformes, o tipo II globosas e com dois núcleos evidentes e o tipo III globosas e uninucleadas. As células do tipo II foram as mais abundantes independentemente da idade do cultivo. O material secretado (MS) das culturas de glândula salivar apresentou as atividades anticoagulante e apirásica e uma maior concentração de bandas na faixa de 15-25 kDa. No cultivo de canal salivar de *R. prolixus* foram observadas apenas células uninucleares que se apresentaram aderidas ao ducto salivar, formando uma camada única de células justapostas. A partir do terceiro dia de cultivo foram observados grânulos de secreção se formando ao redor das células do canal, indicando que as células estavam metabolicamente ativas e sugerem que o canal salivar possui outras funções além de simplesmente conduzir a saliva em direção as peças bucais do inseto. Entretanto, não foi evidenciada atividade anticoagulante e apirásica no MS do cultivo de canal salivar. Já os cultivos de intestino médio anterior de *Triatoma brasiliensis* e de *T. infestans*, ao MO, apresentaram células globosas, geralmente agrupadas. No interior destas células verificou-se a presença de vesículas, sugerindo produção de biomoléculas. No MS dos cultivos intestinais detectou-se as atividades anticoagulante e lisozímica. A adição de β ecdisona nos cultivos intestinais de *T. infestans* alterou o perfil protéico e de atividade anticoagulante em relação ao controle (sem adição de hormônio), sugerindo uma ação inibidora sobre a produção de biomoléculas intestinais. Já a adição de serotonina aparentemente não alterou o perfil protéico e nem das atividades anticoagulante e lisozímica. Entretanto, o teste de viabilidade detectou que a maioria das células intestinais de *T. brasiliensis* e *T. infestans* encontraram-se mortas no oitavo dia de cultivo. A curta sobrevivência do intestino médio anterior nas condições de cultivo utilizadas no presente trabalho provavelmente dificultou o estudo da influência hormonal sobre a atividade das células intestinais. Nossos resultados demonstraram que é possível obter cultura primária de glândula salivar, canal salivar e intestino médio anterior de triatomíneos para o estudo de biomoléculas *in vitro*.

ABSTRACT

Triatomines are haematophagous insects vectors of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi*. The vectorial capacity of triatomines in human hosts is directly related to their feeding performance. The present work aims at obtaining and standardizing primary cultivations of the salivary glands, salivary canal and anterior midgut from triatomines for the study of bioactive molecules related to haematophagy. The salivary gland cells from *Rhodnius prolixus* remained viable in cultures for 30 days. Three types of cells were identified in the salivary gland cultures under optical microscopy (MO): the type I were elongated and fusiform cells, the type II were globular with two evident nucleuses and the type III were globular and uninuclear. Type two cells were most abundant independently on the time of cultivation. The secreted material (MS) from salivary gland cultures presented anticoagulant and apyrase activities and higher concentration of bands around 15-25 kDa. In *R. prolixus* salivary canal cultures, cells were uninuclear and adhered to the salivary duct, forming a unique layer of juxtaposed cells. Secretion granules were observed surrounding the canal cells starting on the third day of cultivation, indicating the cells were metabolically active and suggesting the salivary canal has functions other than simple conduct the saliva to the mouthparts of the insect. No anticoagulant or apyrase activities were evidenced in the MS from the salivary canal cultures. The *Triatoma brasiliensis* and *T. infestans* anterior midgut cultivations presented globular cells found organized in clusters under MO. Vesicle were observed in the cells, suggesting the productions of biomolecules. The intestinal MS presented anticoagulant and lysozime activities. The addition of β ecdysone in the intestinal cultivations from *T. infestans* altered the proteic and anticoagulant activity profile in relation to the control (with no hormone addition), suggesting an inhibitory action over the production of intestinal biomolecules. The addition of serotonin apparently did not alter the proteic profile neither the profile of the anticoagulant and apyrase activities. However, the viability tests detected that most of the intestinal cells from *T. brasiliensis* and *T. infestans* were dead in the day 8 of cultivation. The short half-life of the anterior midgut cells in the cultivation conditions probably impaired the study of the hormonal influence on the intestinal cell activities. The results showed that it is possible to obtain primary culture of salivary gland, salivary canal and anterior midgut from triatomines for the study of biomolecules *in vitro*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fases evolutivas do ciclo de <i>Rhodnius prolixus</i> Stal, 1859.	15
Figura 2	Ninfas de quinto estágio de <i>Triatoma brasiliensis</i> (A) e <i>Triatoma infestans</i> (B).	17
Figura 3	Desenho esquemático de um dos pares da glândula salivar de <i>Triatoma infestans</i> mostrando as subunidades (D1, D2 e D3).	22
Figura 4	Corte longitudinal do hilo entre duas subunidades (D1 e D2) de glândula salivar de <i>Triatoma infestans</i> .	23
Figura 5	Unidades da glândula salivar de <i>Rhodnius domesticus</i> a fresco sem coloração, vista em microscópio estereoscópico.	24
Figura 6	Células da glândula salivar de <i>Rhodnius neglectus</i> submetidas à técnica de Gömori (Gömori, 1950).	25
Figura 7	Corte longitudinal do canal salivar principal de <i>Panstrongylus megistus</i> observado ao microscópio óptico.	26
Figura 8	Ninfa de quarto estágio de <i>Triatoma brasiliensis</i> dissecado (sem o tergo) para visualização da localização do seu tubo digestivo.	27
Figura 9	Tubo digestivo de triatomíneo e suas principais divisões.	27
Figura 10	Células da válvula cardíaca do intestino médio anterior de <i>Triatoma infestans</i> .	28
Figura 11	Células constituintes do intestino médio anterior de <i>Triatoma infestans</i> .	29
Figura 12	Cultura primária da glândula salivar (A-F) e do canal salivar (G e H) de <i>Rhodnius prolixus</i> .	42
Figura 13	Cultura primária de glândula salivar de <i>R. prolixus</i> corada por Giemsa a 3%.	43
Figura 14	Concentração de proteínas (A), atividade anticoagulante (B), atividade apirásica (C) e SDS-PAGE a 15% (D) do material secretado (MS) e extrato solúvel do dia 30 (ES-30) dos cultivos primários de glândula salivar e canal salivar de <i>Rhodnius prolixus</i> em função do tempo de cultivo.	44
Figura 15	Culturas primárias da glândula salivar e do canal salivar de <i>Rhodnius prolixus</i> coradas pelo kit Live/Dead Viability/Citotoxicity (Molecular Probes®).	46

Figura 16	Células observadas em explantes de tecido de intestino médio anterior de <i>Triatoma brasiliensis</i> em cultura (A-B).	47
Figura 17	Concentração de proteínas (A) e atividade anticoagulante (B) do material secretado (MS) e extrato solúvel (ES) dos cultivos de intestino médio anterior de <i>Triatoma brasiliensis</i> em função do tempo de cultivo.	48
Figura 18	SDS-PAGE a 10% do material secretado (MS) (A) e extrato solúvel (ES) (B) de cada dia de cultivo de intestino médio anterior de <i>Triatoma brasiliensis</i> em comparação com o perfil de bandas do conteúdo intestinal de uma ninfa de terceiro estágio (C).	49
Figura 19	Perfil da concentração de proteínas (A) e atividade anticoagulante (B) do material secretado (MS) dos cultivos de intestino médio anterior de <i>Triatoma brasiliensis</i> não tratados (controle) e tratados com serotonina (1,0 e 5,0 μM) e β ecdisona (1,0 μM) adicionado no momento da semeadura e a cada troca de meio.	50
Figura 20	SDS-PAGE a 10% do material secretado (MS) e extrato solúvel (ES) dos cultivos de intestino médio anterior de <i>Triatoma brasiliensis</i> tratados com serotonina a 1 μM (S) e não tratados (controle) (C).	52
Figura 21	Concentração de proteínas (A) e atividade anticoagulante (B) do material secretado (MS) e extrato solúvel do dia 10 (ES-10) dos cultivos de intestino médio anterior de <i>Triatoma infestans</i> cultivados em meio 1 ou meio 2.	53
Figura 22	Concentração de proteínas (A e B), atividade anticoagulante (C e D) e atividade lisozímica (E e F) do material secretado (MS) dos cultivos de intestino médio anterior de <i>Triatoma infestans</i> dos grupos controle, tratados com serotonina a 0,1 e 1,0 μM e β ecdisona 0,1 e 1,0 μM adicionado apenas no momento da semeadura (1x) ou no momento da semeadura e a cada troca de meio.	55
Figura 23	Cultivos de intestino médio anterior de <i>Triatoma infestans</i> cultivados com meio 1 (meio Schneider suplementado com nutrientes e fator de crescimento) corados pelo kit Live/Dead Viability/Citotoxicity (Molecular Probes®).	59

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Estimativa da concentração de proteínas e atividade anticoagulante do material secretado (MS) e do extrato solúvel (ES) do oitavo dia de cultivo de intestino médio anterior de <i>Triatoma brasiliensis</i> não tratados (controle) e tratados com serotonina (1,0 e 5,0 μM) e β ecdisona (1,0 μM) adicionado no momento da semeadura e a cada troca de meio.	51
Tabela II	Estimativa da concentração de proteínas, atividade anticoagulante e atividade lisozímica do material secretado (MS) e do extrato solúvel (ES) do décimo quarto dia de cultivo de intestino médio anterior de <i>Triatoma infestans</i> não tratados (controle) e tratados com serotonina (0,1 e 1,0 μM) adicionado só no momento da semeadura (1x) ou no momento da semeadura e a cada troca de meio.	56
Tabela III	Estimativa da concentração de proteínas, atividade anticoagulante e atividade lisozímica do material secretado (MS) e do extrato solúvel (ES) do décimo quarto dia de cultivo de intestino médio anterior de <i>Triatoma infestans</i> não tratados (controle) e tratados com β ecdisona (0,1 e 1,0 μM) adicionado só no momento da semeadura (1x) ou no momento da semeadura e a cada troca de meio.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MS	material secretado
ES	extrato solúvel
H.E.H.	hematoxilina férrica de Heidenhein
N.S.	não significante
Conc. Proteína	concentração de proteína
Ativ. Anticoag	atividade anticoagulante
Ativ. Liso	atividade lisozímica
FL	filamento
VR	vacúolo
NU	núcleo
NUC	nucléolo
CRO	cromatina
MPR	membrana peritoneal
AC	anéis cuticulares
CSA	canal salivar
EP	epitélio
MU₂	musculatura circular
MU₃	musculatura longitudinal
MO	microscópio óptico
SDS	sódio dodecil sulfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Doença de Chagas e os triatomíneos	15
1.2	Triatomíneos de interesse no presente estudo	16
1.3	Ingestão de sangue pelos triatomíneos	17
1.4	Biomoléculas salivares dos triatomíneos	19
1.5	Biomoléculas intestinais dos triatomíneos	20
1.6	Anatomia e histologia da glândula salivar e canal salivar dos triatomíneos	21
1.7	Anatomia e histologia do intestino dos triatomíneos	26
1.8	Estudos de cultivo celular	30
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	Geral	32
3.2	Específicos	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Manutenção dos insetos	33
4.2	Obtenção das culturas primárias	33
4.2.1	Glândula salivar e canal salivar de <i>R. prolixus</i>	33
4.2.1.1	Meios de cultura utilizados	33
4.2.1.2	Protocolo experimental	33
4.2.2	Intestino médio anterior de <i>T. brasiliensis</i> e <i>T. infestans</i>	35
4.2.2.1	Meios de cultura utilizados	35
4.2.2.2	Protocolo experimental	35
4.3	Obtenção das amostras	36
4.4	Monitoramento do conteúdo protéico e da atividade biológica presentes nas amostras obtidas a partir das culturas primárias de glândula salivar, canal salivar ou intestino médio anterior de triatomíneos	37
4.4.1	Estimativa do conteúdo protéico	37

4.4.2	Atividade apirásica	37
4.4.3	Tempo de recalcificação de plasma humano citratado	37
4.4.4	Atividade lisozímica	38
4.4.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	38
4.5	Teste de viabilidade celular das culturas primárias	39
4.6	Análise estatística dos resultados	39
5	RESULTADOS	40
5.1	Cultivos de glândula salivar e canal salivar de <i>R. prolixus</i>	40
5.1.1	Otimização do cultivo primário de células da glândula salivar	40
5.1.2	Otimização do cultivo primário do canal salivar	40
5.1.3	Descrição microscópica dos cultivos primários de glândula salivar e canal salivar	41
5.1.4	Monitoramento dos cultivos primários de glândula salivar e canal salivar	43
5.1.5	Viabilidade celular dos cultivos primários de glândula salivar e canal salivar	45
5.2	Cultivo de intestino médio anterior de <i>T. brasiliensis</i> e <i>T. infestans</i>	47
5.2.1	Otimização do cultivo primário de intestino médio anterior	47
5.2.2	Descrição microscópica do cultivo primário de intestino médio anterior	47
5.2.3	Monitoramento do cultivo primário de intestino médio anterior	48
5.2.3.1	Cultivos de <i>T. brasiliensis</i>	48
5.2.3.1.1	Amostras de material secretado (MS) e extrato solúvel (ES) do cultivo de intestino médio anterior	48
5.2.3.1.2	Adição de serotonina e β ecdisona nos cultivos de intestino médio anterior	50
5.2.3.2	Cultivos de <i>T. infestans</i>	53
5.2.3.2.1	Efeito da suplementação do meio no cultivo de intestino médio anterior	53
5.2.3.2.2	Adição de serotonina e β ecdisona no cultivo de intestino médio anterior	54
5.2.4	Viabilidade celular dos cultivos primários de intestino médio anterior de <i>T. brasiliensis</i> e <i>T. infestans</i>	58

6	DISCUSSÃO	60
6.1	Cultivo de glândula salivar e canal salivar de <i>R. prolixus</i>	60
6.2	Cultivo de intestino médio anterior de <i>T. brasiliensis</i> e <i>T. infestans</i>	62
6.3	Influência de hormônios na cultura primária de intestino médio anterior de triatomíneos	63
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	ANEXO - Artigo científico: “Primary culture of <i>Rhodnius prolixus</i> (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland cells”	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas e os triatomíneos

Endêmica nas Américas, a doença de Chagas é uma moléstia tropical transmitida pelas fezes dos triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) e causada pelo *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (CHAGAS, 1922; KOLLIEN e SCHAUB, 2000; SCHOFIELD *et al.*, 2006). Trata-se de uma doença infecciosa parasitária com aproximadamente 10 milhões de pessoas infectadas no mundo e outras 40 milhões vivendo em áreas de risco (SCHOFIELD *et al.*, 2006). Os países mais afetados localizam-se na região neotropical entre as latitudes 42° norte e 46° sul. No Brasil, a doença de Chagas acomete cerca de três milhões de pessoas (DIAS, 2001).

Além do *T. cruzi*, os triatomíneos também transmitem o protozoário *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) pela picada, porém é geralmente considerado não-patológico para humanos e animais, mas pode causar danos ao seu hospedeiro invertebrado (WATKINS, 1971; HECKER *et al.*, 1990; GARCIA *et al.*, 1994).

Os triatomíneos são insetos pertencentes à Classe Insecta, Ordem Hemiptera, Superfamília Reduvidoidea, Família Reduviidae, Subfamília Triatominae (LENT e WYGODZINSKY, 1979).

Estes insetos são paurometábolos, tendo seu ciclo biológico compreendido pelas formas de ovo, ninfa (com cinco estádios) e adulto (Fig. 1), sendo que exercem a hematofagia desde que eclodem dos ovos. Os triatomíneos são primitivamente silvestres (SHERLOCK, 1979), mas, com a ação antrópica sobre os ambientes naturais, muitas espécies se dispersaram, passando a viver associadas à moradia humana (BARRETO, 1979).

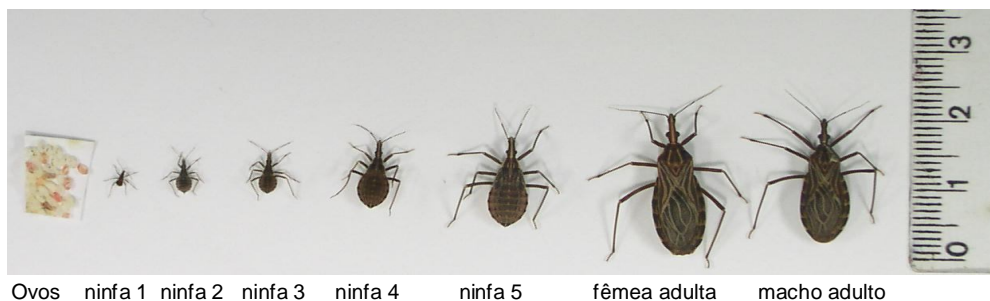


Figura 1: Fases evolutivas do ciclo de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859.

1.2. Triatomíneos de interesse no presente estudo

- *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 (Triatominae, Rhodniini) (Fig. 1) é o principal vetor do gênero no norte da América do Sul (Venezuela e Colômbia), onde é encontrado em habitats silvestres, principalmente na copa de palmeiras (SCHOFIELD, 1994), ou também, estabelecido no domicílio (LENT e WYGODZINSKY, 1979). Também é importante espécie vetora da doença de Chagas em algumas partes da América Central, como Guatemala, Honduras e El Salvador, onde apresenta hábitos quase que exclusivamente domésticos (SCHOFIELD, 1994). *R. prolixus* é um dos mais importantes modelos experimentais sob o qual os fundamentos da fisiologia dos insetos foram construídos (WATKINS, 1971).
- *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Triatominae, Triatomini) (Fig. 2 A) é o principal vetor do *T. cruzi* no nordeste do Brasil, predominantemente nas zonas secas, sendo encontrado atualmente nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Tocantins, Goiás, Bahia e norte de Minas Gerais. No ambiente silvestre, *T. brasiliensis* é encontrado associado com ninhos de roedores, gambás e pássaros, assim como abrigos de várias espécies de morcegos. Ele transmite o *T. cruzi* entre roedores e gambás e também é capaz de colonizar tanto o domicílio quanto o peridomicílio, espoliando sangue dos humanos e dos animais domésticos (ALENCAR, 1987). Isso aumenta a importância do *T. brasiliensis* como vetor, uma vez que espécimes silvestres podem recolonizar as habitações humanas onde tenha havido, anteriormente, um controle destes insetos pela aspersão de inseticidas (DIOTAIUTI *et al.*, 2000).
- *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Triatominae, Triatomini) (Fig. 2 B) é o vetor da doença de Chagas mais importante em todo o sudeste da América do Sul. É uma espécie domiciliada, encontrada no interior de habitações em estado precário e no peridomicílio. Espécimes silvestres eram praticamente encontradas apenas na Bolívia. Acredita-se que, a partir desse foco originário, a espécie teria se dispersado, de forma passiva, por quase metade do continente sul americano (SCHOFIELD, 1994), sendo encontrada na Argentina, Chile, Bolívia, Paraguai, Uruguai, Brasil e Peru. Em 2006, após eficaz atuação do “Programa de Controle da Doença de Chagas”, o Brasil foi certificado pela Organização Pan-Americana de Saúde como livre de transmissão pelo *T. infestans* (SCHOFIELD *et al.*, 2006). Apesar de atualmente ter menor importância

como vetor, juntamente com o *R. prolixus*, é um dos principais modelos experimentais para estudos de transmissão do *T. cruzi* e do processo hematofágico dos triatomíneos.



Figura 2: Ninfas de quinto estágio de *Triatoma brasiliensis* (A) e *Triatoma infestans* (B).

1.3. Ingestão de sangue pelos triatomíneos

Os triatomíneos são ectoparasitos solenofágicos, isto é, que obtêm o sangue diretamente dos vasos (vênulas ou arteríolas) da pele dos hospedeiros vertebrados (SCHOFIELD, 1994). Suas mandíbulas serrilhadas perfuram e ancoram o aparato bucal na região superficial da pele, enquanto as maxilas penetram até a derme. Imediatamente após a introdução do fascículo (um par de mandíbulas e um par de maxilas) na pele do hospedeiro, inicia-se a fase de sondagem, em que as maxilas realizam movimentos oscilatórios, como um chicote, até penetrarem em um vaso sanguíneo, passando, então, à fase de ingurgitamento (LAVOPIERRE *et al.*, 1959).

Ao introduzir as peças bucais na pele do hospedeiro em busca de sangue, os artrópodes hematófagos desencadeiam uma série de respostas fisiológicas em seu hospedeiro, dentre elas a hemostasia, reação inflamatória e resposta imune (RIBEIRO e FRANCISCHETTI, 2003). Tais fenômenos fisiológicos podem interferir na eficiência do processo de alimentação desses insetos (GUARNERI *et al.*, 2000; SANT'ANNA *et al.*, 2001), sendo assim, os triatomíneos produzem diversas moléculas bioativas em sua glândula salivar e intestino que vão contrapor reações fisiológicas do hospedeiro e favorecer a alimentação.

O sangue ingerido pelo inseto juntamente com saliva é estocado no intestino médio anterior do triatomíneo. Deste sangue estocado, água e íons são absorvidos, sendo transportados para a hemolinfa e túbulos de Malpighi. Os componentes não absorvidos vão passando em pequenas quantidades para o intestino médio posterior e em seguida para o

intestino posterior do inseto onde sofrem digestão, sendo os metabólitos não utilizados pelo inseto excretados via reto (KOLLIEN e SCHAUB, 2000). Não há presença de membrana peritrófica, mas o epitélio intestinal produz um revestimento extracelular (membrana perimicrovilar) que provavelmente, em parte, executa a mesma função (SCHOFIELD, 1994).

A coordenação do mecanismo de alimentação dos triatomíneos não é muito bem entendida, principalmente porque está associada com sinais externos e internos do próprio inseto (SMITH, 1985). Um destes sinais internos consiste na liberação e ação da serotonina (5-hidroxitriptamina). A serotonina é conhecida como reguladora de atividades alimentares em vários invertebrados (LONG e MURDOCK, 1983; LENT e DICKINSON, 1988; NÄSSEL, 1988; KAUFMANN *et al.*, 2004) e mamíferos (SIMANSKY, 1996). Em *R. prolixus*, a serotonina desempenha papel importante na regulação de diferentes mecanismos fisiológicos desencadeados pela alimentação, incluindo plasticização da cutícula abdominal (permitindo a distensão abdominal do inseto e, assim, possibilitando a ingestão de grande quantidade de sangue por repasto) (REYNOLDS, 1974; 1985; ORCHARD *et al.*, 1988; LANGE *et al.*, 1989; ORCHARD, 2006), salivação, mobilidade intestinal, bem como aumento da filtração e secreção de fluidos pelo intestino e túbulos de Malpighi (ORCHARD, 2006).

Outro hormônio sinalizador interno de insetos é a ecdisona (20-hidroxiecdisona) que tem papel importante no processo de metamorfose dos insetos, induzindo forte resposta celular incluindo proliferação, maturação e apoptose que ocorrem durante a ecdise (CHAPMAN, 1998; TZOU *et al.*, 2000). Alguns trabalhos mostram que a ecdisona tem a função de modular a imunidade humoral inata em *Anopheles gambiae* Giles, 1962 (AHMED *et al.*, 1999; MULLER *et al.*, 1999), *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (DIMARCQ *et al.*, 1997; LANOT *et al.*, 2001; SORRENTINO *et al.*, 2002), *Neobelliera bullata* (FRANSSENS *et al.*, 2006), *R. prolixus* (FEDER *et al.*, 1997). Ela também induz a vitelogênese em fêmeas adultas de *Aedes aegypti* (FALON *et al.*, 2003). De acordo com Zhang e Palli (2009), este hormônio está relacionado com indução de expressão gênica de peptídioglicanos antimicrobianos. Além disso, a ecdisona também está envolvida com o mecanismo de alimentação, auxiliando, juntamente com componentes encontrados no sangue, no desenvolvimento da membrana perimicrovilar no intestino médio de triatomíneos (AZAMBUJA *et al.*, 1993; GONZALEZ *et al.*, 1998; ALBUQUERQUE-CUNHA *et al.*, 2004).

1.4. Biomoléculas salivares dos triatomíneos

Para permitir uma alimentação rápida e eficiente, triatomíneos possuem uma ampla variedade de componentes fisiologicamente ativos na saliva, os quais são responsáveis pelos mecanismos de ingestão e digestão do sangue (BARTH, 1954; RIBEIRO *et al.*, 1998; LACOMBE, 1999). As espécies de triatomíneos estudadas até o momento apresentaram diferenças no repertório de moléculas salivares e nas suas atividades. Enquanto as proteínas salivares mais abundantes em *Rhodnius* são as nitroforinas, em *Triatoma*, as mesmas não são observadas (CHAMPAGNE *et al.*, 1995). A apirase salivar e as atividades anticoagulante e vasodilatadora mostraram diferenças quantitativas e qualitativas entre as espécies de triatomíneos estudadas (RIBEIRO *et al.*, 1998).

Em *R. prolixus*, a família das lipocalinas é a mais abundante e inclui um grande número de moléculas diferentes (MONTFORT *et al.*, 2000) com cerca de 18 a 22 kDa (RIBEIRO *et al.*, 2004). Várias lipocalinas foram identificadas e estudadas, dentre elas as nitroforinas, um grupo de hemeproteínas que transportam óxido nítrico e promovem a vasodilatação incluindo a NP2, que é um anticoagulante inibidor do fator Xa da cascata de coagulação (HELLMANN e HAWKINS, 1965; CHAMPAGNE *et al.*, 1995; RIBEIRO *et al.*, 1995; ISAWA *et al.*, 2000); proteínas carreadoras de aminas biogênicas (BABP) que remove serotonina e mediadores adrenérgicos da vasoconstrição (ANDERSEN *et al.*, 2003); proteínas carreadoras de ADP, que tem alta afinidade por adenosina e participam da ativação e agregação plaquetária (FRANCISCHETTI *et al.*, 2000); e um grupo de moléculas não caracterizadas relacionadas ao inibidor de trombina, chamado triabina, encontrado em *Triatoma pallidipennis* Stal, 1945 (NOESKE-JUNGBLUT *et al.*, 1995; FUENTES-PRIOR *et al.*, 1997). Além das lipocalinas, encontra-se na saliva a enzima apirase. Esta enzima hidrolisa ATP e ADP, sendo um potente inibidor da agregação plaquetária (RIBEIRO e GARCIA, 1981; SARKIS *et al.*, 1986; FAUDRY *et al.*, 2004); fosfolipídios anti-hemostáticos como as lisofosfatidilcolina (GOLODNE *et al.*, 2003); e inibidores dos sistema de complemento humano (CAVALCANTE *et al.*, 2003; BARROS *et al.*, 2009). Novas moléculas com função desconhecida foram identificadas no estudo do sialoma de *R. prolixus*, dentre estes, 74 transcritos distintos que codificam proteínas secretadas, sendo a maioria pertencentes à família das lipocalinas (RIBEIRO *et al.*, 2004).

Uma vez que a saliva dos artrópodes hematófagos afeta a fisiologia do hospedeiro vertebrado no local da picada, ela pode facilitar a infecção deste por parasitos ou patógenos carreados pelo vetor (VALENZUELA, 2002). Titus e Ribeiro (1988) demonstraram que a saliva do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 aumenta a infecção por

Leishmania major (Yakimoff & Schokhor, 1914) quando o parasito é inoculado juntamente com a saliva do vetor. Resultados similares foram obtidos na interação carrapato-vírus (JONES *et al.*, 1989; LABUDA *et al.*, 1993) e também na associação mosquito-vírus (EDWARDS *et al.*, 1998; LIMESAND *et al.*, 2000). Diferentemente do *T. rangeli*, que é inoculado juntamente com a saliva dos triatomíneos, o *T. cruzi* é depositado na pele juntamente com as fezes do inseto. No entanto, o local da picada do triatomíneo é considerado um importante sítio para a penetração do *T. cruzi* (SCHUSTER e SCHAUB, 2000). É provável que algumas atividades descritas na saliva dos triatomíneos, como a atividade anti-complemento (CAVALCANTE *et al.*, 2003) por exemplo, facilitem a infecção.

1.5. Biomoléculas intestinais dos triatomíneos

Há evidências consistentes mostrando que processos intestinais podem influenciar o tamanho da alimentação sanguínea. Araujo e colaboradores (2007) demonstraram que a inibição, por RNA interferente ou pela ingestão de trombina, da atividade anticoagulante do intestino médio anterior do *T. brasiliensis* levou à redução significativa da quantidade de sangue ingerido pelos insetos. A explicação para esta redução foi que o sangue no intestino precisa estar em baixa viscosidade durante a alimentação ou então a pressão hídrica vinda do intestino, induzida pela alta viscosidade, interferiria com o bombeamento do sangue para o intestino médio. Uma vez que a formação de fibrina se inicia, ocorre um aumento repentino na viscosidade com a formação do coágulo (PUCKETT *et al.*, 2005). Sendo assim, evitar o aumento da viscosidade do sangue no tubo digestivo, durante a fase de bombeamento de sangue, parece ser uma função fisiológica importante no intestino de insetos hematófagos.

Anticoagulantes intestinais foram descritos em várias espécies de triatomíneos. Em intestino de *R. prolixus*, o inibidor da coagulação sanguínea é denominado rodinina (FRIEDRICH *et al.*, 1993); em *T. infestans* infestina (CAMPOS *et al.*, 2002) e em *T. brasiliensis* brasiliensina (ARAUJO *et al.*, 2007). Tanto a infestina quanto a brasiliensina foram encontradas na parte anterior do intestino médio dos respectivos insetos.

A capacidade de artrópodes de inibir a via alternativa do complemento foi descrita pela primeira vez na saliva de carrapatos ixodídeos (RIBEIRO, 1987). Foi observado também que, a saliva de fêmeas de *L. longipalpis* é capaz de inibir o sistema do complemento humano atuando tanto sobre a via clássica quanto sobre a via alternativa (CAVALCANTE *et al.*, 2003). Recentemente, a atividade anti-complemento foi encontrada na saliva e no conteúdo intestinal de triatomíneos. Esses inibidores foram capazes de inativar tanto a via clássica quanto a via alternativa do complemento humano (CAVALCANTE *et al.*, 2003; BARROS *et*

al., 2009), provavelmente protegendo as células intestinais dos insetos da ação deste sistema de complemento (BARROS *et al.*, 2009).

As lectinas são proteínas que também já foram descritas no trato digestivo de artrópodes hematófagos. Estas moléculas têm afinidade por carboidratos e participam de processos efetadores, receptores e reguladores em artrópodes como carrapatos, triatomíneos, mosquitos, flebotomíneos e moscas tsé-tsé. As funções das lectinas estão envolvidas com imunidade inata, adesão celular, diferenciação tecidual, refração ou suscetibilidade a parasitos ou patógenos, diferenciação e desenvolvimento de estágios de parasitos ou patógenos vetor-específicos, dentre outras (GRUBHOFFER *et al.*, 1997).

Os triatomíneos também produzem peptídios antimicrobianos intestinais, como a enzima lisozima, que também está presente na hemolinfa de insetos (AZAMBUJA e GARCIA, 1987; HULTMARK, 1996; URSIC BEDOYA *et al.*, 2005). Ela já foi detectada no intestino de *R. prolixus* (LOPEZ *et al.*, 2003), *T. infestans* (KOLLIEN *et al.*, 2003) e *T. brasiliensis* (ARAUJO *et al.*, 2006a), tendo-se maior taxa de expressão desta enzima na porção do intestino médio anterior (KOLLIEN *et al.*, 2003; ARAUJO *et al.*, 2006a).

A lisozima auxilia na resposta imune não-específica dos insetos contra bactérias. Esta enzima hidrolisa ligações β (1-4) glicosídicas de peptidoglicanos da parede celular de bactérias gram positivas e causa ruptura celular (RUSSELL e DUNN, 1991; DAFFRE *et al.*, 1994). Ela também contribui na degradação da parede celular de bactérias que estão morrendo por outros fatores (BOMAN *et al.*, 1991).

De acordo com alguns estudos, atividades de hemaglutinação têm sido detectadas em vários tecidos de triatomíneos como hemolinfa, glândulas salivares, estômago e intestino médio anterior. Isto sugere que o desenvolvimento do *T. cruzi* pode estar associado a esses componentes, principalmente porque este parasito completa seu desenvolvimento no lúmen do intestino do triatomíneo, não invadindo a hemocele do hospedeiro (PEREIRA *et al.*, 1981; GREGORIO e RATCLIFFE, 1991; HYPSE e GRUBHOFFER, 1995).

1.6. Anatomia e histologia da glândula salivar e canal salivar dos triatomíneos

As glândulas salivares dos artrópodes podem ser definidas como órgãos que sintetizam e secretam produtos que contribuem na aquisição de alimento. Elas aumentam ou diminuem de tamanho nos diferentes estados funcionais do inseto. As glândulas salivares encontram-se no tórax, geralmente lateralmente ao esôfago e estão ligadas à bomba salivar, situada na cabeça do inseto, por canais salivares (BARTH, 1954; LACOMBE, 1957).

A partir de estudos realizados ao microscópio óptico (MO), Barth (1954), demonstrou que o *T. infestans* apresenta um par de glândulas salivares que são formadas por três subunidades denominadas D1, D2 e D3. Entre as subunidades D1 e D2 há um hilo as unindo. Neste hilo chegam dois canais, o canal salivar principal que parte da bomba salivar e um canal mais fino, o canal salivar secundário que depois de uma curvatura pela parte posterior da cabeça, retorna e desemboca na glândula D3 (Fig. 3) (BARTH, 1954).

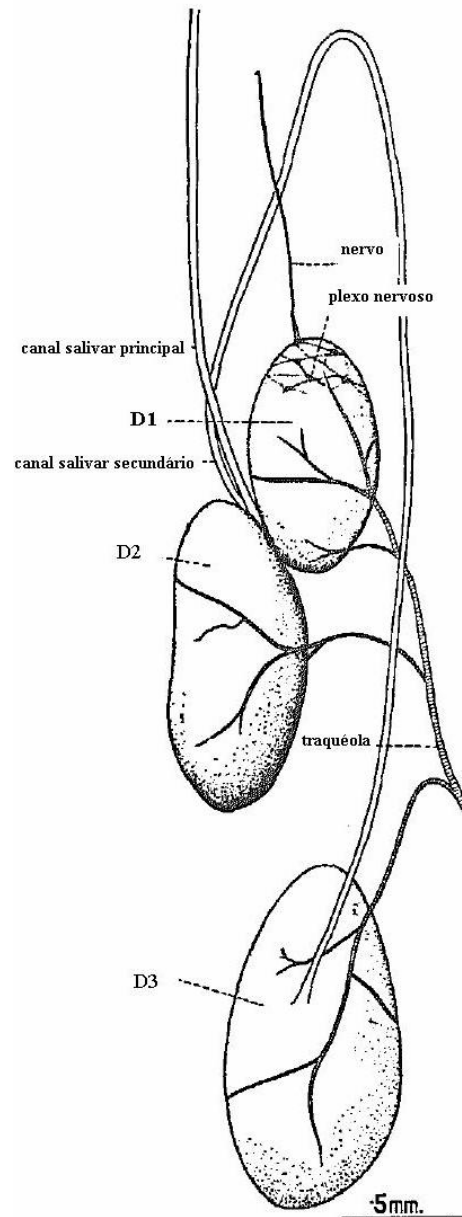


Figura 3: Desenho esquemático de um dos pares da glândula salivar de *Triatoma infestans* mostrando as subunidades (D1, D2 e D3). Adaptado de Baptist (1941).

As secreções da subunidade D3 são levadas até a região denominada hilo através do canal salivar secundário, para se unir aos conteúdos das subunidades D1 e D2 (Fig. 4). O canal salivar principal leva as secreções das subunidades D1, D2 e D3, após se encontrarem no hilo, até as peças bucais do triatomíneo (BARTH, 1954).

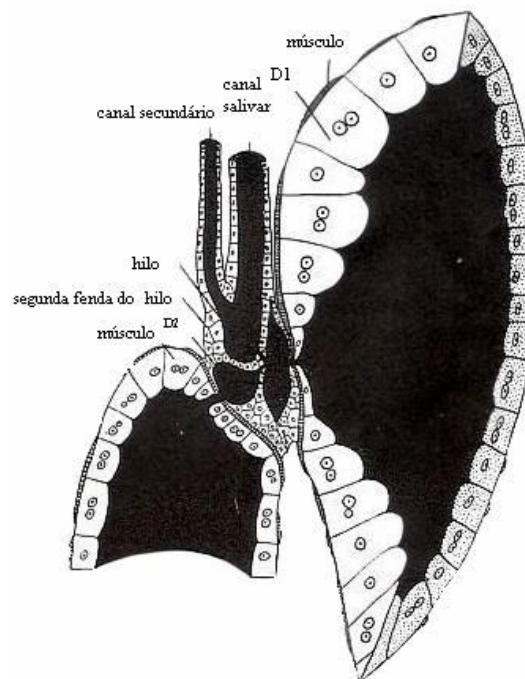


Figura 4: Corte longitudinal do hilo entre duas subunidades (D1 e D2) de glândula salivar de *Triatoma infestans* (BARTH, 1954).

Em *Rhodnius domesticus* Neiva e Pinto, 1923 é encontrado um par de glândulas salivares, porém apresentam apenas duas subunidades glandulares que são independentes: a maior (glândula principal) é avermelhada e claramente visível durante a dissecação, enquanto a menor (glândula acessória) é arredondada e incolor (MEIRELLES *et al.*, 2003) (Fig. 5). A saliva deste gênero possui hemoproteínas com atividades multifuncionais apresentando uma cor avermelhada (RIBEIRO *et al.*, 1993; CHAMPAGNE *et al.*, 1995; MEIRELLES *et al.* 2003).

Utilizando microscopia eletrônica de varredura, Meirelles e colaboradores (2003) obtiveram uma melhor visualização das unidades da glândula salivar e dos canais salivares de *R. domesticus* constatando que do hilo que une as subunidades da glândula salivar partem dois canais salivares (Fig. 5). O principal que parte da região mediana da glândula principal e vai até a bomba salivar do inseto e o acessório que parte da base do canal principal e acima da

glândula acessória e conecta-se ao esôfago do inseto. Isso torna possível que algumas secreções salivares possam ser expelidas diretamente no interior do esôfago com o objetivo de facilitar a ingestão e/ou digestão do sangue ingerido (MEIRELLES *et al.*, 2003).

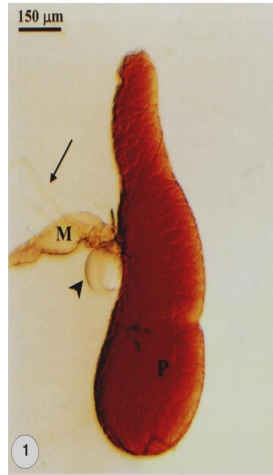


Figura 5: Unidades da glândula salivar de *Rhodnius domesticus* a fresco sem coloração, vista em microscópio estereoscópico. P: glândula principal, (▶): glândula acessória, M: canal salivar principal, (▼): canal salivar acessório (MEIRELLES *et al.*, 2003).

As glândulas salivares dos triatomíneos são formadas por uma camada simples de células epiteliais que circundam um grande lúmen central que contém o material secretado (glândula de reserva) (RIBEIRO, 1995). Estas glândulas são envolvidas por uma fina lâmina basal que contém traqueíolas, fibras musculares/miofibrilas (BARTH, 1954; REIS *et al.*, 2003) e células neuronais (NUSSENZVEIG *et al.*, 1995; MEIRELLES *et al.*, 2003).

A partir de estudos realizados ao MO, as células das glândulas salivares de *T. infestans* (BARTH, 1954; LACOMBE, 1999), *T. pseudomaculata* Corrêa e Espínola, 1964, *T. brasiliensis*, *T. vitticeps* (Stal, 1858), *T. pessoai* Sherlock e Serafim, 1967, *T. pallidipennis* Stal, 1945, *R. prolixus*, *R. neglectus* Lent, 1954, *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e *Diptelogaster máxima* (Uhler, 1894) (LACOMBE, 1999) apresentam-se binucleadas possuindo um ou mais nucléolos. A subunidade D1 é constituída de epitélio simples e alto e a subunidade D2 baixo e bem definido (LACOMBE, 1999). Entretanto, a partir de estudos realizados utilizando microscopia óptica e eletrônica, as células glandulares de *T. infestans* (REIS *et al.*, 2003) e *R. domesticus* (MEIRELLES *et al.*, 2003) foram citadas como sendo normalmente uninucleares, ocasionalmente eram encontradas células binucleadas. Apenas na

unidade D3 de *T. infestans* foram ocasionalmente observadas células binucleadas (REIS *et al.*, 2003). Porém, em estudos realizados por microscopia óptica por Anhê e colaboradores (2007), foi observada a predominância de células binucleadas tanto na glândula principal quanto na acessória de indivíduos adultos machos e fêmeas de *R. prolixus*, *R. neglectus*, *P. megistus* e *T. infestans* (Fig. 6).

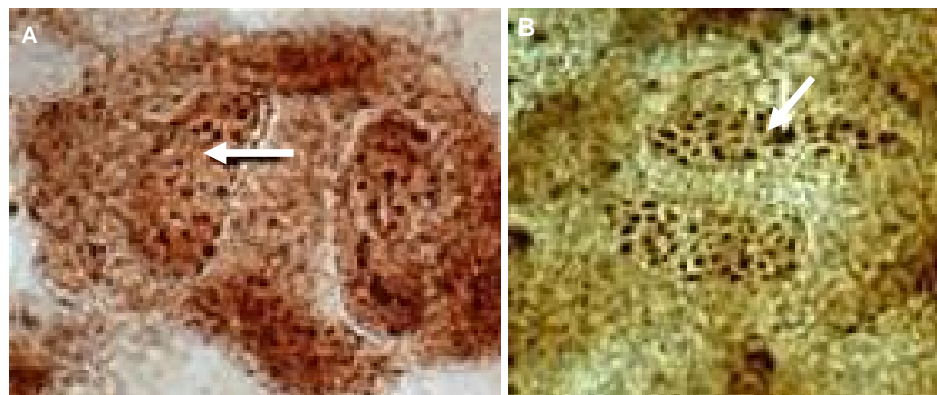


Figura 6: Células da glândula salivar de *Rhodnius neglectus* submetidas à técnica de Gömori (Gömori, 1950). A: célula da glândula principal. B: célula da glândula acessória. As setas indicam o núcleo das células (ANHÊ *et al.*, 2007).

Tanto as células da subunidade D1 como D2, aumentam de tamanho na fase de plena secreção e apresentam vacúolos no protoplasma (BARTH, 1954). Porém, a primeira elimina a secreção com a parte superior da célula que se torna esférica (processo merócrino) e, a segunda, é esgotada sob a forma de explosão do bordo apical das células (processo apócrino) (BARTH, 1954; LACOMBE, 1999; REIS *et al.*, 2003). Já Meirelles e colaboradores (2003), por não observar grânulos de secreção no citoplasma da célula, sugeriram que a secreção ocorra por difusão através da membrana apical das células.

As células epiteliais glandulares medem 20 μm de largura e 50 μm de comprimento e a lâmina basal, onde estão imersas fibras musculares lisas, células neuronais e células traqueais, 0,3 - 0,7 μm (MEIRELLES *et al.*, 2003).

Quanto ao canal salivar principal, compreendido entre a bomba salivar e o hilo, este é formado por anéis cuticulares bem evidentes, densos, equidistantes, paralelos e numerosos, que completam apenas uma ou algumas voltas (BARTH, 1954; LACOMBE, 1999) e, envolvendo este, há grandes células epiteliais que são cobertas externamente por uma lâmina basal onde estão imersas células traqueais (Fig. 7) (MEIRELLES *et al.*, 2003). Os núcleos destas células têm forma esférica (BARTH, 1954) e são ricos em cromatina, os citoplasmas

são pouco densos (LACOMBE, 1999). O material cuticular da parede do tubo possui quitina não muito esclerotizada, enquanto os anéis são muito mais esclerotizados. O canal possui bastante resistência para não ser dobrado nem fechado, mas não perdendo sua flexibilidade (BARTH, 1954).

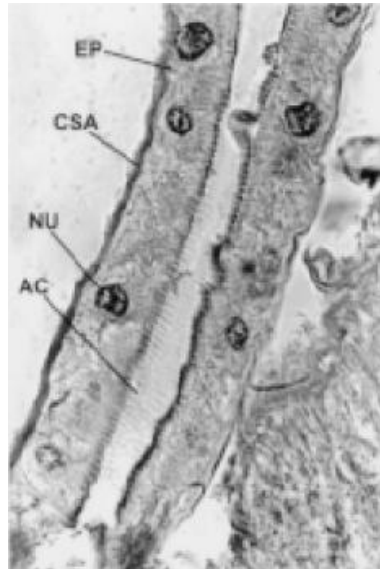


Figura 7: Corte longitudinal do canal salivar principal de *Panstrongylus megistus* observado ao microscópio óptico. Coloração: H.E.H, AC: anéis cuticulares, CSA: canal salivar, EP: epitélio, NU: núcleo. 400x (LACOMBE, 1999).

Todos os canais e espaços do hilo são revestidos por uma camada de quitina, assim como todos os canais salivares. Os bordos das aberturas das cavidades glandulares apresentam válvulas reguladas por musculatura. Pela contração da musculatura a válvula é aberta, e pelo relaxamento se fecha pela elasticidade da parede quitinosa das fendas do hilo. As válvulas em repouso mantêm fechado o lúmen das glândulas evitando a saída de secreções (BARTH, 1954).

1.7 Anatomia e histologia do intestino dos triatomíneos

O tubo digestivo ocupa quase toda a cavidade do corpo do inseto (Fig. 8), sobrando apenas uma pequena área para os demais órgãos. De maneira geral, este órgão pode ser dividido em três regiões principais (Fig. 9): intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (CHAPMAN, 1998). Outra nomenclatura também utilizada e correlata à citada por Chapman (1998) para as divisões do intestino é: estomodeo, mesêntero e proctodeo

(LACOMBE, 1957). O epitélio de todas as partes do tubo digestivo é constituído por uma camada simples de células epiteliais (CHAPMAN, 1998), recoberto por camada muscular e envolvido por traquéias e traqueólas (LACOMBE, 1957).



Figura 8: Ninfa de quarto estágio de *Triatoma brasiliensis* dissecada (sem o tergo) para visualização da localização do seu tubo digestivo (indicado pelo círculo vermelho).

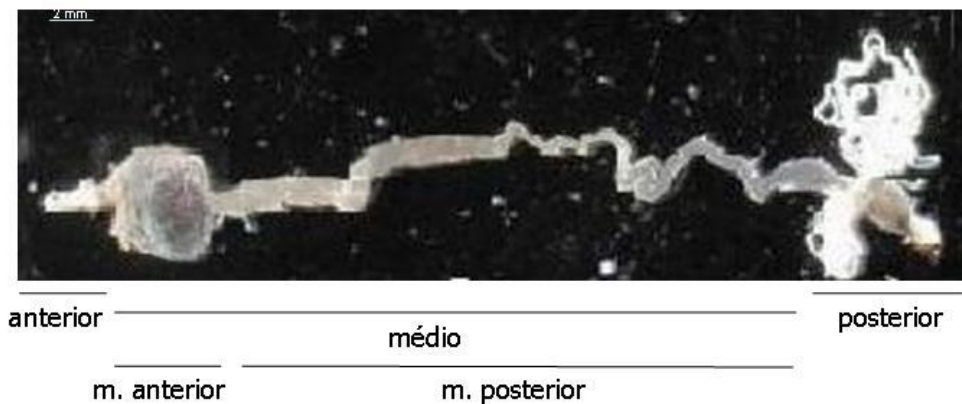


Figura 9: Tubo digestivo de triatomíneo e suas principais divisões (KOLLIEN e SCHAUB, 2000).

O intestino anterior dos insetos tem origem ectodérmica (BALDWIN *et al.*, 1996) e compreende a cavidade bucal, a faringe e o esôfago (RAMÍREZ-PÉREZ, 1969). Esta porção é constituída por uma monocamada de células achatadas revestidas por uma película de quitina. A região anterior do tubo digestivo não está envolvida nos processos de absorção ou secreção (CHAPMAN, 1998).

O intestino médio tem origem endodérmica (BALWIN *et al.*, 1996), é formado por uma monocamada de células colunares que estão ativamente envolvidas na produção e

secreção de moléculas, bem como na absorção de nutrientes facilitada pelos microvilos existentes em seu epitélio luminal (BILLINGSLEY e LEHANE, 1996). Esta porção do intestino, de maneira geral, é o órgão responsável pelo armazenamento e digestão do sangue (em insetos hematófagos) e também de carboidratos (BILLINGSLEY e LEHANE, 1996). Nela também são encontrados inúmeros simbiontes (LACOMBE, 1957). O intestino médio de triatomíneos é dividido em duas partes, a anterior (também conhecida como estômago, “crop” ou promesêntero) e a posterior (chamada de intestino ou postmesêntero) (Fig. 9) (LACOMBE, 1957; BILLINGSLEY e LEHANE, 1996).

No início do intestino médio anterior encontra-se a válvula cardíaca, que é formada pelo crescimento exagerado de suas células e que impede o refluxo do alimento. A região final desta porção do intestino médio é estreita, deixando apenas uma pequena passagem por onde o alimento prossegue, indo para o intestino médio posterior (LACOMBE, 1957).

Embora seja formado por uma única camada de células, o epitélio do intestino médio anterior não se apresenta por igual em todo o setor. As células da válvula cardíaca (Fig. 10) são altas e possuem o protoplasma no pólo apical disposto em filamentos (FL), de início paralelos, depois sinuosos e, finalmente, se desfazem onde há acúmulo de vacúolos (VR). Apresentam núcleos grandes e alongados (NU) com nucléolos centrais (NUC) (LACOMBE, 1957).

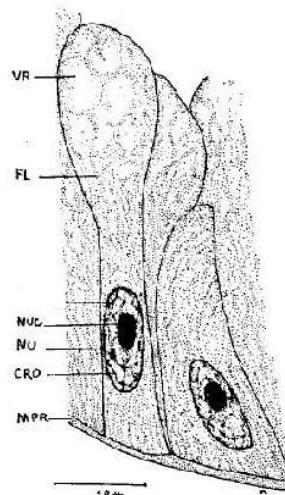


Figura 10: Células da válvula cardíaca do intestino médio anterior de *Triatoma infestans*. CRO: cromatina, FL: filamentos, MPR: membrana peritoneal, NU: núcleo, NUC: nucléolo, VR: vacúolo (LACOMBE, 1957).

As demais células que constituem o intestino médio anterior dos triatomíneos são altas e estreitas, com protoplasma disposto em filamentos longos (FL), porém não formam vacúolos como os das células cardíacas (Fig. 11). Esta disposição do protoplasma está relacionada com o transporte das substâncias ao longo da célula. Estas células são envoltas por musculatura circular (MU₂) desenvolvida e por musculatura longitudinal (MU₃) (LACOMBE, 1957).

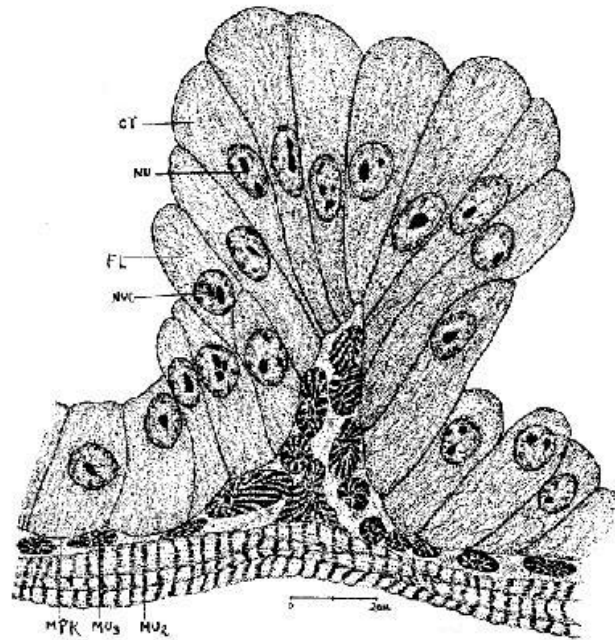


Figura 11: Células constituintes do intestino médio anterior de *Triatoma infestans*. CT: citoplasma, FL: filamentos, MPR: membrana peritoneal, MU₂: musculatura circular, MU₃: musculatura longitudinal, NU: núcleo, NUC: nucléolo (LACOMBE, 1957).

O intestino posterior dos insetos se forma a partir de células do ectoderma (BALDWIN *et al.*, 1996), sendo um tubo longo e sinuoso (LACOMBE, 1957). É constituído principalmente por células ricas em mitocôndrias no ápice, que são responsáveis pelo transporte de íons e água. Nos triatomíneos, o intestino posterior é composto pelo íleo, que recebe a secreção dos túbulos de Malpighi, e o reto (ampola retal) (CHAMPAN, 1998).

1.8 Estudos de cultivo celular

Cultivos de células de diferentes tecidos têm sido muito usados como modelos de estudo, incluindo tecidos secretórios como glândulas salivares (DURBAN, 1990; CARMEL *et al.*, 1999; ALVAREZ-HERNANDEZ *et al.*, 2003), lacrimais (BEAUREGARD *et al.*, 2002), mamárias (GERMAN & BARASH, 2002), traqueais (FINKBEINER *et al.*, 2009), pituitária de mamíferos (YAMAMURO *et al.*, 2001), glândula de veneno de *Crotalus durissus* Linnaeus, 1758 (DUARTE *et al.*, 1999) e de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) (CARNEIRO *et al.*, 2006). Recentemente, a biologia celular tem sido bastante aplicada a estudos na área de entomologia para melhor entendimento da morfologia e fisiologia de órgãos de invertebrados tidos como pragas agrícolas, animais peçonhentos ou como vetores de patógenos humanos e animais. Alguns destes cultivos celulares descritos pela literatura são de glândula salivar de *Triatoma protracta* Uhler, 1894 (MARSHALL, 1982), glândula de veneno da formiga *Pseudomyrmex triplarinus* (Weddell, 1850) (HINK & BUTZ, 1985) e da aranha *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) (SILVA *et al.*, 2008), hemócitos de *Drosophila melanogaster* (ZHANG e PALLI, 2009), células embrionárias de ovos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (ARDILA *et al.*, 2005), órgão produtor de amebócitos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (BARBOSA *et al.*, 2006), células intestinais de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) (LARA *et al.*, 2005), *Manduca sexta* Linnaeus 1763, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797), *Heliothis virescens* Fabricius, 1777, *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 e *Bombus terrestris* Linnaeus 1758 (HAKIM *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

A glândula salivar e o intestino dos triatomíneos produzem uma diversidade de moléculas bioativas sendo grande parte com atividade e/ou função biológica desconhecida. Existe um grande interesse em estudar essas moléculas uma vez que elas interferem na performance alimentar, e conseqüentemente na dinâmica populacional dos insetos e transmissão do *T. cruzi*. Como ocorreu com outros artrópodes hematófagos, o estudo dessas moléculas poderia também levar a descoberta de novas substâncias com potenciais aplicações farmacológicas.

Os estudos de moléculas intestinais e salivares enfrentam duas principais barreiras. A primeira seria a dificuldade de produzir e/ou isolar estas moléculas em grandes quantidades e funcionalmente ativas que permitam submetê-las a ensaios biológicos. A segunda seria conseguir amostras destas moléculas sem contaminações que possam interferir em ensaios de caracterização funcional. O conteúdo intestinal, por exemplo, contém de 20 a 90% de hemoglobina, dependendo do estágio fisiológico do inseto, que interferem significativamente nos estudos de proteínas intestinais.

Frente a estes problemas, a obtenção de cultura primária de células secretórias de glândula salivar e intestino de triatomíneos permitiria produzir as moléculas expressas e secretadas por estes órgãos *in vitro* em quantidades maiores e em amostras mais puras para serem submetidas a estudos de identificação, caracterização estrutural, atividade e função biológica para o inseto.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Obter e otimizar o cultivo primário da glândula salivar, canal salivar e intestino médio anterior de triatomíneos para o estudo de moléculas bioativas relacionadas com a hematofagia.

3.2. Específicos

- Obter e padronizar e otimizar cultura primária de células de glândula salivar e canal salivar de *R. prolixus*.
- Estudar em função do tempo a viabilidade celular e a produção/secreção de biomoléculas do cultivo primário de glândula salivar e canal salivar de *R. prolixus*.
- Monitorar a atividade biológica (anticoagulante e apirásica) no material produzido/secretado pelo cultivo primário da glândula salivar e canal salivar de *R. prolixus* como modelo para proteínas salivares.
- Obter e otimizar cultura do intestino médio anterior de *T. brasiliensis* e *T. infestans*.
- Estudar em função do tempo a viabilidade celular e a produção/secreção de biomoléculas do cultivo primário do intestino médio anterior de *T. brasiliensis* e *T. infestans*.
- Monitorar a atividade biológica (anticoagulante e lisozímica) no material produzido/secretado pelo cultivo primário do intestino médio anterior de *T. brasiliensis* e *T. infestans* como modelo de proteínas produzidas no intestino médio anterior.
- Estudar a influência da adição de hormônios (serotonina e β ecdisona) aos cultivos primários de intestino médio anterior de *T. brasiliensis* e *T. infestans*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Manutenção dos insetos

As colônias de *R. prolixus*, *T. brasiliensis* e *T. infestans* foram mantidas em insetário sob condições semi-controladas de temperatura e umidade ($28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $65 \pm 5\%$), com fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro) no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG. A alimentação dos insetos foi realizada semanalmente em galinhas ou ratos.

Para a realização de cultura da glândula salivar e do canal salivar foram utilizados espécimes adultos de *R. prolixus* de ambos os sexos e para cultura do intestino médio anterior foram utilizadas ninfas de quinto estágio de *T. brasiliensis* e *T. infestans*.

4.2 Obtenção das culturas primárias

4.2.1 Glândula salivar e canal salivar de *R. prolixus*

4.2.1.1 Meios de cultura utilizados

Para a padronização do cultivo primário de glândula salivar e canal salivar foram realizados testes preliminares com os meios de cultura para inseto IPL-41 (Sigma), TNM-FH (Sigma), Grace (Sigma), Schneider (Sigma).

Estes meios foram suplementados com 30 mg/mL de triptose fosfato (Sigma), 20% de soro fetal bovino inativado, 10 µg/mL de fator de crescimento epitelial de rato (Sigma), 45 mg/mL de glicose (Sigma), 30 mg/mL de glutamina (Sigma), 2 mg/mL de insulina (Sigma), suplemento para meio de inseto 10x (proteínas pequenas < 150 µg/mL) (Sigma), 10 mg/mL de tetraciclina (Sigma), 2,5 mg/mL de anfotericina B (Sigma) e 50 mg/mL de gentamicina (Sigma) em pH 7,0.

4.2.1.2 Procedimento experimental

Para a obtenção das glândulas salivares e canais salivares foram utilizados insetos adultos de *R. prolixus* (10 ± 2 dias após a muda) 24 horas ou 5 dias após alimentação em rato (*Rattus rattus*). Estes insetos foram imobilizados em banho de gelo, desinfetados por imersão consecutiva durante 2 minutos em detergente comercial diluído em água (2% V/V) e em hipoclorito de sódio 0,04 - 0,06% (V/V) e durante 5 minutos em etanol 70% (V/V).

Após este procedimento os insetos foram levados para a capela de fluxo laminar para serem dissecados sob microscópio estereoscópico. Com o auxílio de pinça, o escutelo do inseto foi levemente levantado e puxado para cima e para frente até que este, juntamente com

a cabeça, se destacasse do corpo. Ao realizar estes movimentos, as glândulas salivares e os canais salivares foram expostos junto com a porção anterior do tubo digestivo. Estes foram recobertos com solução salina 0,9% estéril para facilitar a extração das estruturas salivares. Após a coleta, o aparelho salivar (glândula principal e acessória e canal salivar principal) foi transferido para um tubo de microcentrífuga contendo meio de cultura.

Uma vez dentro do tubo de microcentrífuga, o aparelho salivar foi fragmentado com o auxílio de uma tesoura oftálmica, seguido de centrifugação a 800 g por cinco minutos. O sedimento formado foi submetido a tratamento com colagenase tipo XI (Sigma) ou com tripsina (Sigma) visando obter a desagregação das células do tecido. O tratamento por colagenase foi realizado em duas etapas consecutivas nas concentrações de 2 mg/mL e 4 mg/mL com incubação à temperatura ambiente por 20 minutos e 40 minutos, respectivamente. Já no tratamento com tripsina EDTA, esta foi adicionada ao sedimento na concentração de 2,5 mg/mL por 15 minutos também em temperatura ambiente. Após o tratamento enzimático, o material foi lavado por três vezes e semeado em placa de cultura de 6 orifícios (15 glândulas salivares/orifício) contendo 25 µL de meio de cultura por orifício.

Em experimentos posteriores, a glândula salivar e o canal salivar principal foram isolados com auxílio de estiletos e transferidos, separadamente, para tubos de microcentrífuga contendo meio de cultura estéril. No cultivo de canal salivar isolado, este foi apenas extraído, lavado por três vezes e semeado em placa de cultura de 6 orifícios (15 canais salivares/orifício) contendo 25 µL de meio de cultura por orifício.

Os cultivos preparados, tanto de glândula salivar quanto de canal salivar, foram colocados em um recipiente plástico contendo atmosfera úmida e incubados em temperaturas de 15 ou 28°C. Para a manutenção dos cultivos, o meio de cultura usado foi trocado por meio fresco a cada 5 dias. Estes cultivos foram acompanhados por 30 dias.

Em alguns experimentos de glândula salivar e de canal salivar, o material celular constituinte destes tecidos foi semeado sobre lamínula depositada no fundo dos orifícios da placa de cultura. Após a adesão das células, a lamínula foi retirada e o material foi fixado com uma solução de metanol e ácido acético (3:1) por 15 minutos e depois coradas com solução de Giemsa a 3% por 5 minutos. Posteriormente, a lamínula foi montada sobre lâmina e observada ao MO.

4.2.2 Intestino médio anterior de *T. brasiliensis* e *T. infestans*

4.2.2.1 Meios de cultura utilizado

Para o cultivo primário de intestino médio anterior de triatomíneos foi utilizado o meio de cultura para inseto Schneider (Sigma). Este foi utilizado nos cultivos com duas suplementações distintas. Uma como descrito no item 4.2.1.1 e denominado de meio 1 e outra em que se adicionaram somente antibióticos e antifúngico [10 mg/mL de tetraciclina (Sigma), 50 mg/mL de gentamicina (Sigma) e 2,5 mg/mL de anfotericina B (Sigma) em pH 7,0], que foi denominado de meio 2.

4.2.2.2 Procedimento experimental

Para a obtenção do intestino médio anterior, ninfas de quinto estágio (10 ± 2 dias de jejum após a última ecdise) foram imobilizadas em banho de gelo, desinfetadas por imersão consecutiva durante 2 minutos em detergente comercial diluído em água (2% V/V) e em hipoclorito de sódio 0,04 - 0,06% (V/V) e durante 5 minutos em etanol 70% (V/V).

Após este procedimento os insetos foram levados para a capela de fluxo laminar para serem dissecados sob microscópio estereoscópico. Inicialmente os conexivos laterais do triatomíneo foram cortados longitudinalmente com o auxílio de uma tesoura oftálmica. Utilizando uma pinça, a parte dorsal (tergo) foi levantada, expondo os órgãos localizados no tórax e abdome. Assim que o tergo foi removido, adicionou-se uma gota de solução salina 0,9% estéril para despregar os órgãos e assim facilitar a visualização do intestino médio anterior. Em seguida, esta porção intestinal foi isolada e transferida para uma placa de Petri contendo meio de cultura. Uma vez na placa de Petri, o intestino foi aberto longitudinalmente com auxílio de estilete, transferido para tubo de microcentrífuga contendo meio Schneider e, a partir daí, lavado por cinco vezes em meio de cultura e semeado em placa de cultura de 6 orifícios (2 intestinos médio anterior/orifício) contendo 25 μ L de meio de cultura por orifício.

As placas contendo os cultivos foram incubadas à 28°C dentro de um recipiente plástico com atmosfera úmida. Para a manutenção dos cultivos de intestino médio anterior dos triatomíneos o meio de cultura usado foi trocado por meio fresco a cada 2 dias. O tempo de acompanhamento dos cultivos foi de 8 a 14 dias.

Com o objetivo de avaliar a influência da serotonina (0,1, 1,0 e 5,0 μ M) e da β ecdisona (0,1 e 1,0 μ M) nos cultivos primários de intestino médio anterior de *T. brasiliensis* e

T. infestans, estes dois hormônios foram adicionados aos cultivos juntamente com o meio de cultura fresco. Esta adição ocorreu só no momento da semeadura dos intestinos (dia 0) ou no momento da semeadura e a cada troca de meio (dia 2, 4, 6, 8, 10 12, 14).

4.3 Obtenção das amostras

Para avaliar a produção/secreção, bem como a atividade biológica de moléculas dos cultivos primários descritos acima (glândula salivar, canal salivar e intestino médio anterior) foram produzidas amostras a partir do meio de cultura (usado ou fresco) e do extrato solúvel de células e/ou tecido como descrito a seguir.

Amostra do material secretado (MS) foi obtida a partir do meio de cultura usado coletado em cada troca de meio. Após a coleta, o meio usado foi centrifugado (12000 g por 5 minutos) e armazenado individualmente em tubos de microcentrífuga a -80°C até a sua utilização.

Amostra do extrato solúvel de células/tecido (ES) foi obtida conforme descrito a seguir. No último dia de cultivo, após a retirada do meio usado, 25 µL de meio de cultura fresco foram adicionados em cada orifício da placa de cultura e, com o auxílio da pipeta automática, o material foi homogeneizado para a coleta das células/tecidos aderidos. Este material foi transferido para tubos de microcentrífuga sendo, em seguida, submetidos ao banho de ultrassom (Branson 1510) por cerca de 5 segundos para o rompimento das células/tecidos. Para a separação da parte solúvel, este material foi centrifugado à 12000 g por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo de microcentrífuga. Após o preparo, os extratos solúveis (ESs) foram armazenados a -80°C até a sua utilização.

Já a amostra controle foi obtida a partir do mesmo meio fresco utilizado na manutenção dos cultivos. Após a coleta, o meio fresco sofreu o mesmo tratamento descrito acima para as amostras de material secretado.

4.4 Monitoramento do conteúdo protéico e da atividade biológica presentes nas amostras obtidas a partir das culturas primárias de glândula salivar, canal salivar ou intestino médio anterior de triatomíneos

4.4.1 Estimativa do conteúdo protéico

A estimativa da quantidade de proteínas solúveis totais das amostras de MS, ES e controle foi realizada pelo método de Bradford (1976) utilizando soro albumina bovina como padrão. A quantidade de proteínas obtida nas amostras de MS e ES foi subtraída da quantidade encontrada no respectivo meio fresco em que o cultivo foi mantido (amostra controle).

4.4.2 Atividade apirásica

Para estimar a atividade apirásica foi medida a liberação de fosfato inorgânico (PO_4) de acordo com Araujo e colaboradores (2006b). Resumidamente, cinco microlitros de cada amostra (MS, ES e controle) foram diluídos na proporção de 1:4 em tampão HEPES 20 mM /NaOH pH 7,5 e distribuídos em placa de ELISA de 96 orifícios. Posteriormente adicionou-se 80 μL /orifício de tampão HEPES 20 mM /NaOH contendo 2 mM de ATP e 5 mM de CaCl_2 pH 7,5. A placa preparada foi incubada a 37°C por 20 minutos. Após incubação, a quantidade de fosfato inorgânico (PO_4) foi estimada utilizando o kit comercial Labtest Diagnóstica (Brasil) conforme recomendações do fabricante. A quantidade de fosfato inorgânico obtida nas amostras de MS e ES foi subtraída da quantidade encontrada no respectivo meio fresco em que o cultivo foi mantido (amostra controle).

4.4.3 Tempo de recalcificação de plasma humano citratado

Para os ensaios de tempo de recalcificação foram utilizados *pools* de plasma humano pobre em plaquetas citratado (concentração final citrato de sódio de 0,38%), obtido do sangue de pelo menos cinco voluntários normais através de punção venosa seguida de centrifugação a 4000 g durante 15 minutos. Os *pools* obtidos foram aliquotados em tubos de microcentrífuga e armazenados a -20°C até a sua utilização.

O tempo de coagulação do plasma recalcificado foi estimado pelo monitoramento da sua turbidez em leitor de microplacas (Molecular Devices/Versa Max) segundo Ribeiro (2000). Para tal, 5 μL de cada amostra (MS, ES e controle) foram diluídos em 25 μL de tampão HEPES 20 mM/NaOH pH 7,4 e distribuídas em placa de ELISA de 96 orifícios. À placa montada foram adicionados 30 μL /orifício de plasma humano citratado e esta foi

incubada à 37°C por 5 minutos. Após incubação, o processo de coagulação foi disparado pela adição de 30 µL/orifício de CaCl₂ 25 mM pré-aquecido à 37°C. Imediatamente após o disparo da reação, foram feitas as leituras da turbidez a cada 12 segundos durante 35 minutos em leitor de microplacas a 650 nm. O tempo de coagulação do plasma para as amostras testadas foi definido como o tempo necessário para que a turbidez atingisse 0,025 ou 0,040 unidades de absorbância (dependendo da linha de base obtida). O tempo de recalcificação obtido nas amostras de MS e ES foi subtraído do tempo encontrado no respectivo meio fresco em que o cultivo foi mantido (amostra controle).

4.4.4 Atividade lisozímica

A atividade da enzima lisozima foi determinada medindo o decréscimo da turbidez à 655 nm de uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (1 mg/mL) (Sigma) diluído em tampão HEPES 20 mM/NaOH pH 7,4 (adaptado de Cançado *et al.*, 2008). Este decréscimo ocorre quando há a degradação da parede bacteriana de *M. lysodeikticus* por lisozimas digestivas. O volume final da reação foi de 200 µL, sendo 5 µL de cada amostra (MS, ES ou controle). A cinética foi realizada durante 15 minutos com intervalo de 30 segundos entre as leituras à 28°C. O valor da atividade lisozímica foi expresso pela velocidade máxima obtida a partir do ajuste linear dos valores de absorbância encontrados durante a observação. A atividade lisozímica obtida nas amostras de MS e ES de culturas de intestino médio anterior foi subtraída da atividade encontrada no respectivo meio fresco em que o cultivo foi mantido (amostra controle).

4.4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970). Para a detecção das proteínas, o gel foi corado com nitrato de prata conforme descrito abaixo.

Inicialmente o gel foi incubado em solução fixadora (50% metanol) por 20 minutos. Em seguida, incubado por 1 minuto em solução de tiosulfato de sódio (0,4 g/L) e posteriormente em solução de nitrato de prata (2 g/L) por 20 minutos. Após transcorrido este tempo, o gel foi revelado pela solução composta por carbonato de sódio (60 g/L) e formaldeído (0,05%). Ao alcançar a intensidade e contraste desejado para a visualização das bandas no gel, a revelação foi interrompida com solução inativadora (45% metanol e 10% ácido acético), sendo documentado no sistema de foto-documentação AlphaDigiDoc

(AlphaInnotech). Foram realizadas três lavagens consecutivas com água destilada entre cada solução (adaptado de Rosenberg, 2005).

4.5 Teste de viabilidade celular das culturas primárias

Os cultivos de glândula salivar e canal salivar (*R. prolixus*) e de intestino médio anterior (*T. brasiliensis* e *T. infestans*) tiveram a sua viabilidade avaliada com o Kit Live/Dead Viability/Citotoxicity (Molecular Probes®), conforme recomendações do fabricante.

O kit consiste de dois compostos fluorescentes, acetometoxi-calceína e iodeto de propídio que marcam células vivas e células mortas, respectivamente. A acetometoxi-calceína ao entrar nas células vivas é clivada por esterases celulares liberando a calceína (excitação/emissão 495/515 nm), um composto que fluoresce na cor verde, que não pode atravessar a membrana celular ficando retido no interior da célula. O iodeto de propídio não se acumula em células vivas. Este composto penetra em células mortas e se intercala no DNA destas células assumindo uma fluorescência na cor vermelha (excitação/emissão 495/635 nm).

A fluorescência foi visualizada por meio do microscópio de contraste de fase e epifluorescência (Axio Vert 200, Zeiss).

4.6 Análise estatística dos resultados

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad InStat™ (Wass, 1998) para Windows. As variáveis foram comparadas pelo teste t de “student” ou pela análise de variância (ANOVA), identificando-se, no caso da análise de variância, os grupos responsáveis pelas diferenças através do teste “Tukey honest significant difference” (HSD). Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão (EP). O nível de significância aceito foi de $p < 0,05$ (95%).

5 RESULTADOS

5.1 Cultivos de glândula salivar e canal salivar de *R. prolixus*

5.1.1 Otimização do cultivo primário de células da glândula salivar

Dentre os meios de cultura testados para o cultivo primário de células de glândula salivar de *R. prolixus*, o meio Schneider foi o que promoveu melhor adesão celular, possibilitando que as células permanecessem vivas por mais tempo. Outra variável testada na padronização do cultivo foi o intervalo de tempo entre repasto dos insetos e o preparo do cultivo (24 horas e 5 dias), sendo que, culturas realizadas 5 dias após o repasto geralmente não apresentaram células aderidas à placa de cultura (Fig. 12 A) e estas, geralmente morreram em menos tempo do que as células que se aderiram. O intervalo de 24 horas pós-alimentação (Fig. 12 B e C), demonstrou melhor resultado, pois as culturas apresentaram uma quantidade maior de células aderidas à placa (Fig. 12 C), possibilitando que estas permanecessem vivas por mais tempo.

Com relação aos dois tratamentos enzimáticos testados (colagenase e tripsina), a colagenase (Fig. 12 C) possibilitou a melhor visualização dos tipos celulares das glândulas salivares de *R. prolixus* por danificar menos as células e permitir a obtenção de formas e tipos celulares não observados nos experimentos quando os tecidos foram digeridos com tripsina (Fig. 12 B). Quanto à temperatura (15 ou 28°C), a ideal para a sobrevivência das células de cultura primária de glândula salivar foi a de 28°C.

Desta forma, após a fase de padronização (mostrada na Fig. 12 A-C), todas as culturas primárias de glândula salivar (sem o canal salivar) foram obtidas utilizando o meio de cultura Schneider, insetos com 24 horas de repasto, a enzima colagenase e a temperatura de incubação de 28°C.

5.1.2 Otimização do cultivo primário do canal salivar

Inicialmente o canal salivar foi cultivado junto com a glândula salivar. Entretanto, o canal salivar mostrou-se sensível aos dois tratamentos enzimáticos testados objetivando a dissociação celular (tripsina e colagenase). Desta forma, o cultivo primário do canal salivar foi obtido utilizando o meio de cultura Schneider, insetos com 24 horas de repasto e a temperatura de incubação de 28°C sem o tratamento enzimático.

5.1.3 Descrição microscópica dos cultivos primários de glândula salivar e canal salivar

Após a adesão celular, que geralmente ocorreu após o terceiro dia de cultivo, foi possível visualizar, ao MO, três tipos celulares nas culturas da glândula salivar isolada de *R. prolixus*, sendo denominadas de tipo I, tipo II e tipo III.

O tipo celular I apresentou células alongadas e fusiformes, essas células migraram a partir de explantes de tecidos do órgão em estudo (Fig. 12 D) e apresentaram forma arredondada antes de aderirem à placa. Essa migração foi observada a partir de 4 dias após cultura e foram observadas no cultivo por cerca de 15 dias. Este tipo celular foi abundante nos cultivos de glândula salivar.

As células do tipo II foram as mais comuns na cultura. Elas eram globosas com dois núcleos evidentes (Fig. 12 E) e apareciam geralmente em grupo (Fig. 12 C). O tipo III eram células uninucleadas, também globosas, porém foi raro seu encontro nos cultivos (Fig. 12 F), estando geralmente em grupo, juntas as do tipo II. Os tipos II e III permaneceram em cultura por cerca de 30 dias.

No cultivo de canal salivar isolado foram observadas apenas células uninucleares que se apresentaram aderidas ao ducto salivar, formando uma camada única de células justapostas (Fig. 12 G e H). Os canais permaneceram em cultura por cerca de 30 dias. Curiosamente, foram observados grânulos de secreção se formando ao redor das células do canal. Os grânulos foram observados pela primeira vez por volta do dia 3 de cultivo e permaneceram na cultura até o dia 30, porém foram mais abundantes até o dia 16 de cultivo. Os grânulos eram visualizados ligados as células do canal, não sendo observados soltos no meio de cultura.

Na observação das células da glândula salivar coradas por Giemsa foi possível delimitar com facilidade o núcleo e o citoplasma das células bem como identificar novamente dois tipos celulares: o tipo II (Fig. 13 A) e o tipo III (Fig. 13 B).

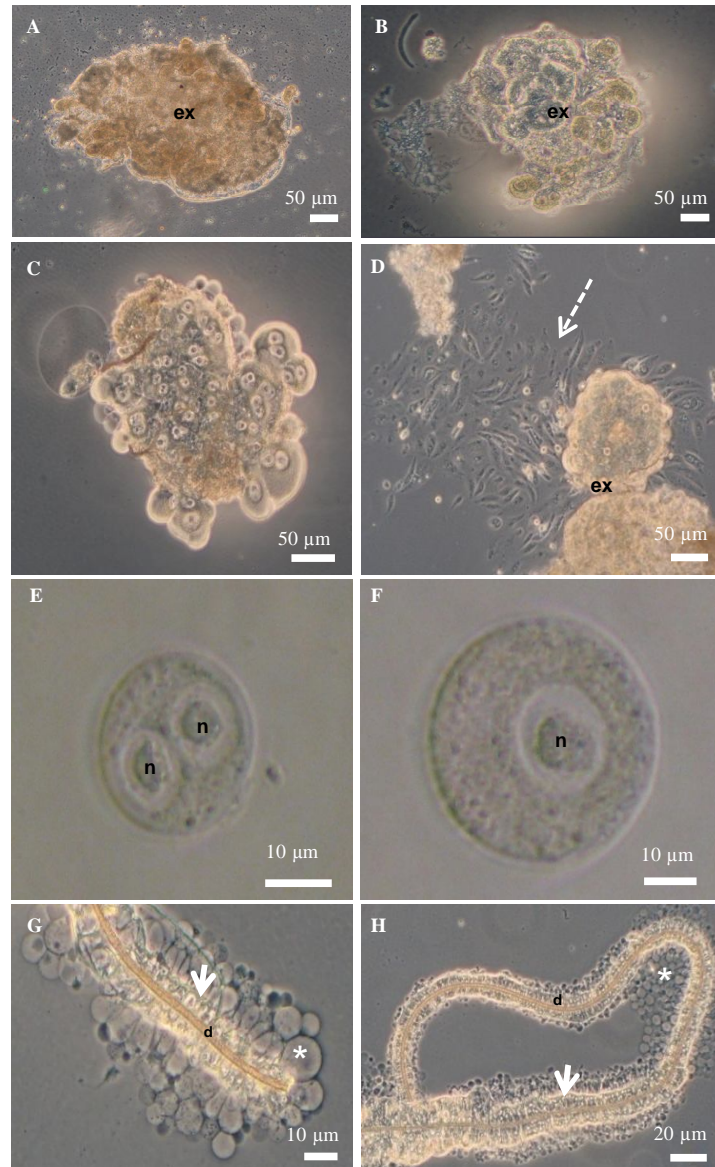


Figura 12: Cultura primária da glândula salivar (A-F) e do canal salivar (G e H) de *Rhodnius prolixus*. A: cultivo obtido de insetos com 5 dias de repasto e dissociado com collagenase, B cultivo obtido de insetos com 24 horas de repasto e dissociado com tripsina, C: cultivo obtido de insetos com 24 horas de repasto e dissociado com collagenase, D: explante de tecido glandular apresentando migração de célula fusiforme do tipo I (↙), E: visão detalhada da célula do tipo II, F: visão detalhada da célula do tipo III. Visão detalhada (G) e visão geral (H) de cultura primária de canal salivar sem tratamento mostrando o ducto salivar (d), a monocamada de células justapostas (↙) e os grânulos de secreção (*). n: núcleos, ex: explante.

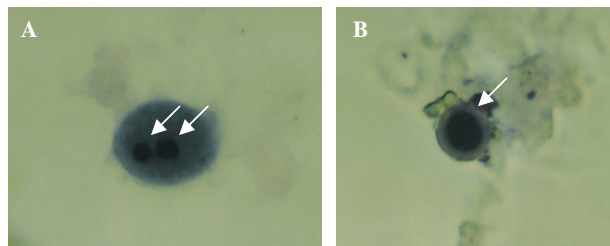


Figura 13: Cultura primária de glândula salivar de *R. prolixus* corada por Giemsa a 3%. A: célula do tipo II apresentando dois núcleos, *aum.* 400x; B: célula do tipo III apresentando um núcleo, 400x. Núcleo indicado pela seta (↗).

5.1.4 Monitoramento dos cultivos primários de glândula salivar e canal salivar

Para monitorar a atividade biológica e a quantidade de biomoléculas no material secretado (MS) e no extrato solúvel (ES) em cultura primária de glândula salivar e canal salivar de *R. prolixus*, foram estimadas a quantidade de proteínas (Fig. 14 A), a atividade anticoagulante (Fig. 14 B), a atividade apirásica (Fig. 14 C) e o perfil eletroforético (SDS-PAGE) (Fig. 14 D).

A quantidade de proteínas (Fig. 14 A) permaneceu similar ao longo dos dias de cultivo analisados. A quantidade de proteínas do MS de 30 dias foi aproximadamente 2x maior do que do ES com mesmo tempo de cultivo (teste t, $p < 0,05$).

As amostras de MS de 5-30 dias de cultivos de glândula salivar apresentaram tanto atividade anticoagulante (Fig. 14 B) como apirásica (Fig 14 C), estas atividades variaram durante o tempo cultivo (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$), sendo que em ambas a maior atividade foi no quinto dia apresentando uma tendência de diminuir com o passar do tempo. Nas amostras de ES de 30 dias, observou-se apenas a atividade apirásica (Fig. 14 C), que foi menor que a atividade encontrada nas amostras MS de 30 dias (teste t, $p < 0,05$). Entretanto, ao se comparar a atividade apirásica específica (micrograma de PO_4 /micrograma de proteína) os valores obtidos foram semelhantes, 0,25 para MS e 0,22 para ES.

A análise das bandas visíveis no SDS-PAGE confirmou a presença de proteínas salivares de *R. prolixus*, que foram melhor visualizadas nos primeiros dias de cultivo (dias 5) (Fig. 14 D). A maior parte das bandas foram observadas apresentando peso molecular em torno de 15 a 25 kDa. A presença de soro fetal bovino no meio dificultou a visualização de proteínas com peso molecular maiores de 66 kDa (Fig. 14 D).

O MS de 5-30 dias das culturas de canal salivar, bem como o ES de 30 dias não apresentaram atividade apirásica nem anticoagulante (dado não mostrado). A concentração de

proteínas presentes nas amostras de MS (Fig.14 A) também apresentou valores similares ao longo dos dias de cultivo analisados (ANOVA/Tukey, N.S.) e sugerem que há produção e secreção de proteínas para o sobrenadante até o fim do cultivo. Porém estas proteínas não foram visualizadas no SDS-PAGE (dado não mostrado).

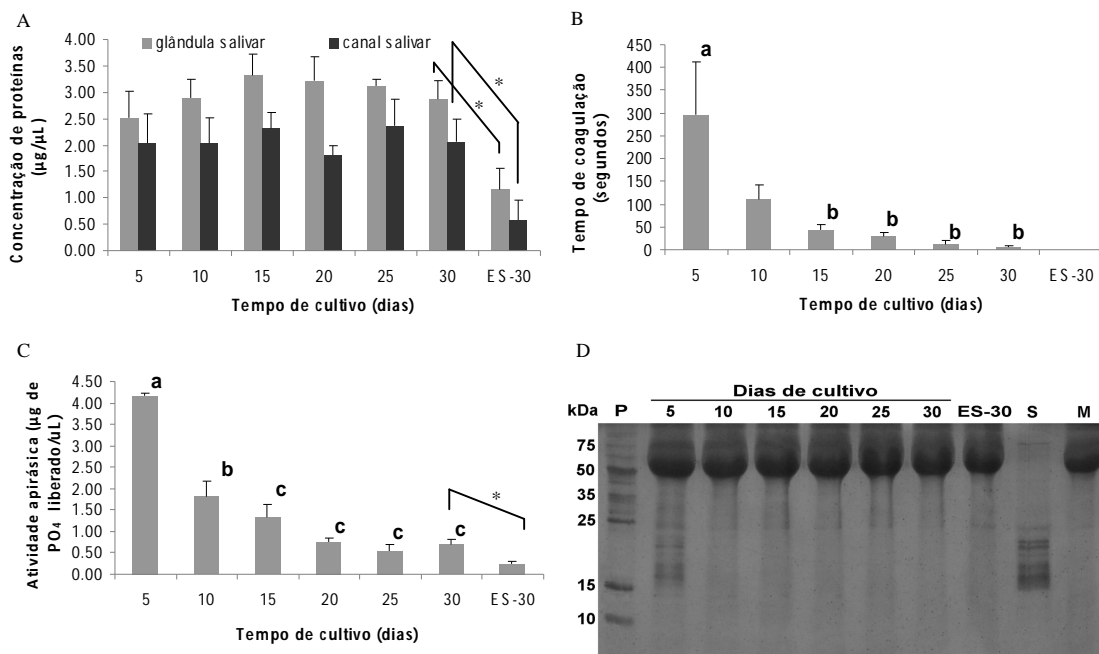


Figura 14: Concentração de proteínas (A), atividade anticoagulante (B), atividade apirásica (C) e SDS-PAGE a 15% (D) do material secretado (MS) e extrato solúvel do dia 30 (ES-30) dos cultivos primários de glândula salivar e canal salivar de *Rhodnius prolixus* em função do tempo de cultivo. As barras representam o erro padrão de cinco amostras, sendo que cada amostra era composta por um pool de dois cultivos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$). O asterisco (*) indica diferença estatística entre duas amostras pelo teste t ($p < 0,05$). P: padrão de peso molecular, S conteúdo salivar, M: meio de cultura Schneider suplementado com nutrientes e fator de crescimento (meio 1). As colunas do gel possui 2 µL de um pool de cinco amostras de cada dia de cultivo, ~6 µg de extrato de células do cultivo, ~6 µg de saliva retirada da glândula de *R. prolixus* adulto 24 horas após alimentação e 2 µL de meio de cultura.

5.1.5 Viabilidade celular dos cultivos primários de glândula salivar e canal salivar

Os grupos de células aderidas visualizados nos cultivos primários sob microscópio invertido sugeriram que os mesmos permaneciam íntegros durante os 30 dias de acompanhamento.

A utilização do kit Live/Dead Viability/Citotoxicity (Molecular Probes®) nas culturas primárias de 15 e 25 dias de cultivo de glândula salivar e de canal salivar permitiu avaliar a viabilidade das células. A observação dos resultados obtidos no dia 15 de cultivo para glândula salivar (Fig. 15 A e B) e canal salivar (Fig. 15 C) e no dia 25 de cultivo para glândula salivar (Fig. 15 D e E) e canal salivar (Fig. 15 F e G), permitiu inferir que nas condições experimentais a maioria das células permaneceram vivas em ambos os cultivos, entremeadas de um pequeno número de células mortas.

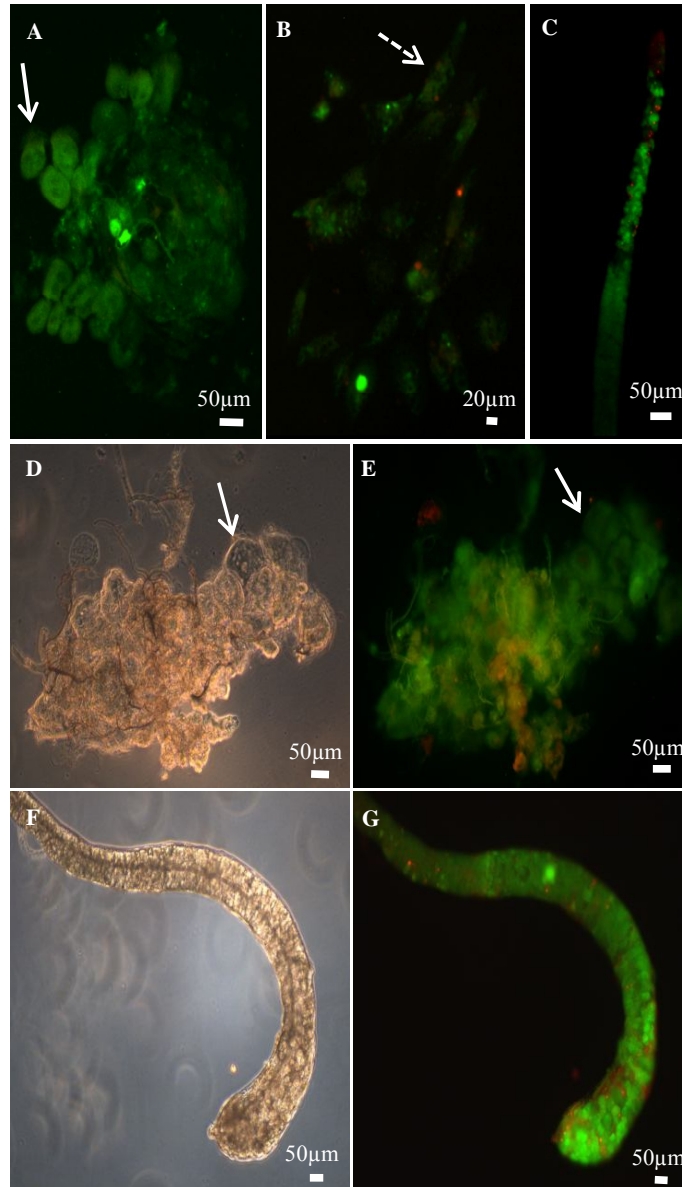


Figura 15: Culturas primárias da glândula salivar e do canal salivar de *Rhodnius prolixus* coradas pelo kit Live/Dead Viability/Citotoxicity (Molecular Probes®). Coloração verde indica célula viva e vermelha célula morta. Fig. A, B e C correspondem ao dia 15 de cultivo de glândula salivar (A e B) e canal salivar (C) observados em microscópio de fluorescência. Fig. D e E correspondem ao dia 25 de cultivo de glândula salivar e Fig. F e G correspondem ao dia 25 de cultivo de canal salivar. Fig. D e F correspondem a imagens por contraste de fase das culturas e Fig. E e G imagens correspondentes a essas para análise de fluorescência. (---▼) indica célula do tipo I (fusiforme), (▼) indica célula do tipo II (binucleada).

5.2 Cultivo de intestino médio anterior de *T. brasiliensis* e *T. infestans*

5.2.1. Otimização do cultivo primário de intestino médio anterior

Inicialmente, as culturas primárias de intestino médio anterior de triatomíneos foram obtidas utilizando o meio de cultura Schneider, insetos de quinto estágio em jejum com aproximadamente 10 dias após a muda, a temperatura de incubação de 28°C e sem tratamento enzimático para a dissociação das células.

O enriquecimento do meio de cultura com nutrientes e fator de crescimento induziu uma maior atividade anticoagulante do MS obtido de cultura primária de *T. infestans* (ver item 5.2.3.2.1).

5.2.2 Descrição microscópica do cultivo primário de intestino médio anterior

A cultura primária do intestino médio anterior destes triatomíneos, observada sem coloração ao MO, mostrou-se fracamente aderido à placa (apenas nas margens do explante) após o primeiro dia de cultivo (Fig. 16 A e B). Este fato dificultou a visualização das células e conseqüentemente a descrição dos tipos celulares constituintes deste órgão. Nos cultivos com mais de 8 dias, o explante não apresentava nenhuma adesão à placa de cultura.

Em alguns cultivos foi possível observar células globosas unicelulares no explante (Fig. 16 A). No interior de algumas destas células foi verificada a presença de vesículas após cerca de dois dias de cultivo (Fig. 16 B), sugerindo produção e secreção de biomoléculas pelas células intestinais dos triatomíneos estudados.

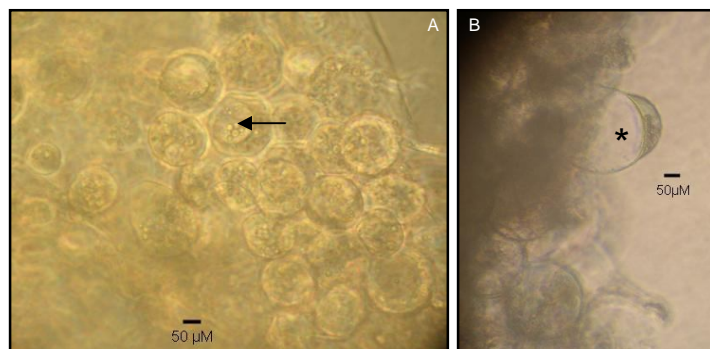


Figura 16: Células observadas em explantes de tecido de intestino médio anterior de *Triatoma brasiliensis* em cultura (A-B). (↖): núcleo, *: vesícula.

5.2.3 Monitoramento do cultivo primário de intestino médio anterior

5.2.3.1 Cultivos de *T. brasiliensis*

5.2.3.1.1 Amostras de material secretado (MS) e extrato solúvel (ES) do cultivo de intestino médio anterior

A quantidade de proteínas (Fig. 17A), a atividade anticoagulante (Fig. 17B) e o perfil eletroforético (Fig. 18) das amostras de MS e de ES foram monitorados a cada dois dias até o oitavo dia de cultivo.

A quantidade de proteína total (MS+ES) em função do tempo de cultivo apresentou uma redução acentuada do dia 2 para o dia 4 (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$) (Fig. 17A). A partir do dia 4, a quantidade de proteínas tendeu a aumentar, mas sem apresentar diferença significativa em relação ao dia 4 (ANOVA/Tukey, N.S.). A quantidade de proteínas do MS e do ES apresentou perfil semelhante a da proteína total. Ao comparar as amostras de MS, o dia 2 apresentou uma quantidade maior de proteínas em relação aos dias 4, 6 e 8 (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$) (Fig. 17A). Já as amostras de ES não apresentaram diferença estatística nos dias de cultivo analisados (ANOVA/Tukey, N.S.). A quantidade de proteína do MS tendeu a ser semelhante a do ES, sendo estatisticamente diferente apenas no dia 6 (teste t, $p < 0,05$) (Fig. 17A).

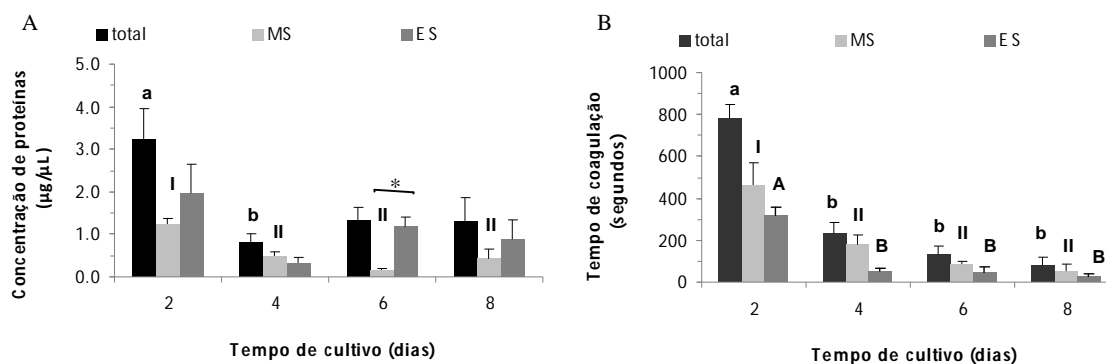


Figura 17: Concentração de proteínas (A) e atividade anticoagulante (B) do material secretado (MS) e extrato solúvel (ES) dos cultivos de intestino médio anterior de *Triatoma brasiliensis* em função do tempo de cultivo. As barras representam o erro padrão de três amostras. Total = MS+ES. Letras (maiúscula ou minúscula) ou números diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$). O asterisco (*) indica diferença estatística entre duas amostras pelo teste t ($p < 0,05$).

A atividade anticoagulante total (MS+ES) também foi maior no dia 2 (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$), seguido de queda contínua de atividade ao longo dos dias de cultivo, mas sem diferença estatística entre os dias 4, 6 e 8 (ANOVA/Tukey, N.S) (Fig. 17B). Este perfil foi observado também no MS e no ES: em ambos, o dia 2 apresentou uma maior atividade anticoagulante em relação aos dias 4, 6 e 8 (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$). A atividade anticoagulante do MS foi maior do que do ES em todos os dias analisados, porém sem diferença estatística significativa (teste t, N.S.) (Fig. 17 B).

O perfil eletroforético do MS (Fig. 18A) e do ES (Fig. 18B) apresentou um grande número de bandas na faixa estudada (225-25 kDa) com um maior número de bandas proeminentes abaixo de 50 kDa. O SDS-PAGE das culturas apresentou-se mais detalhado e fácil de identificar as bandas em comparação com o conteúdo intestinal de ninfas (Fig. 18C) onde a presença de grande quantidade de proteínas do sangue do hospedeiro, especialmente albumina (~66 kDa) e hemoglobina (~17 kDa) dificultam a visualização das proteínas intestinais. Já o perfil eletroforético do meio de cultura utilizado (meio 2) não apresentou bandas visíveis (Fig. 18 D). Nas amostras de MS o número e intensidade das bandas refletiu o perfil observado na quantidade de proteína (Fig. 17A). Entretanto, o mesmo não foi observado com as amostras de ES.

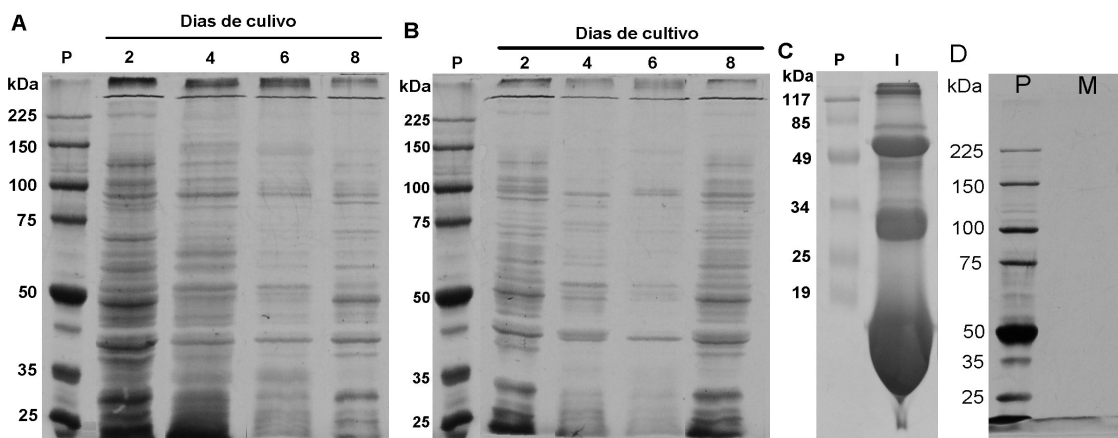


Figura 18: SDS-PAGE a 10% do material secretado (MS) (A) e extrato solúvel (ES) (B) de cada dia de cultivo de intestino médio anterior de *Triatoma brasiliensis* em comparação com o perfil de bandas do conteúdo intestinal de uma ninfa de terceiro estágio (C). Fig. D representa o meio de cultura suplementado com antibióticos e antifúngico (meio 2). P: padrão de peso molecular; I: extratos de intestino médio anterior contendo intestino de uma ninfa de terceiro estágio, 3 dias após a muda e em jejum. As colunas do gel que contém amostras de MS e ES possuem 12 μ L de um pool de três amostras cada, a coluna que contém I possui 3 μ L de amostra de extrato de intestino (referente a 1/2 intestino) e a coluna que contém M possui 12 μ L de meio 2.

5.2.3.1.2 Adição de serotonina e β ecdisona no cultivo de intestino médio anterior

A quantificação de proteínas (Fig. 19 A e Tab. I), a atividade anticoagulante (Fig. 19 B e Tab. I) e o perfil eletroforético (Fig. 20) das amostras de MS foram monitorados a cada dois dias até o oitavo dia de cultivo com ou sem adição de serotonina (1,0 e 5,0 μ M) ou β ecdisona (1,0 μ M). A adição destes hormônios foi realizada juntamente com o meio 2 fresco nas trocas de meio a cada dois dias. A amostra de ES nestas mesmas condições de cultivo foi analisada apenas no dia 8 (Tab. I).

O perfil obtido no monitoramento da quantidade de proteínas das amostras de MS de cultura tratadas com serotonina e com β ecdisona foram semelhantes ao perfil do grupo controle (ANOVA/Tukey, N.S.) (Fig. 19 A). O perfil da atividade anticoagulante do grupo tratado com serotonina 1 μ M não apresentou diferença em relação ao controle (ANOVA/Tukey, N.S.) (Fig. 19 B). Porém, o grupo tratado com β ecdisona 1 μ M no dia 6 apresentou menor atividade do que o controle no mesmo dia (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$) e o grupo tratado com serotonina 5 μ M nos dias 4 e 6 teve atividade menor do que a observada no controle nos respectivos dias de cultivo (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$).

A quantidade de proteínas do ES e do respectivo MS de 8 dias de cultivo foi similar em todos os grupos estudados (teste t, N.S.), já a atividade anticoagulante apresentou diferença estatística nos grupos controle e tratado com serotonina 5 μ M e em ambos a atividade foi maior no MS do que no ES (teste t, $p < 0,05$) (Tab. I).

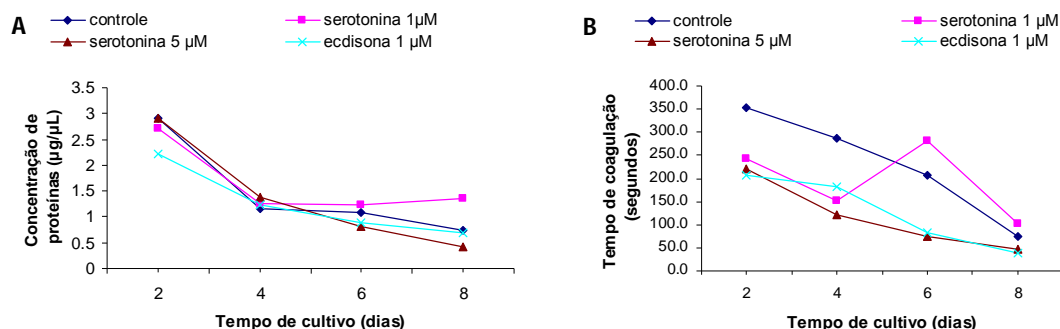


Figura 19: Perfil da concentração de proteínas (A) e atividade anticoagulante (B) do material secretado (MS) dos cultivos de intestino médio anterior de *Triatoma brasiliensis* não tratados (controle) e tratados com serotonina (1,0 e 5,0 μ M) e β ecdisona (1,0 μ M) adicionado no momento da semeadura e a cada troca de meio. Cada ponto representa a média de quatro amostras.

Tabela I: Estimativa da concentração de proteínas e atividade anticoagulante do material secretado (MS) e do extrato solúvel (ES) do oitavo dia de cultivo de intestino médio anterior de *Triatoma brasiliensis* não tratados (controle) e tratados com serotonina (1,0 e 5,0 μM) e β ecdisona (1,0 μM) adicionado no momento da sementeira e a cada troca de meio. Os valores da tabela representam a média de quatro amostras seguido do erro padrão. O asterisco (*) indica diferença estatística entre o controle e cada grupo tratado com os hormônios em questão (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$).

amostra-dia	MS-2		MS-4		MS-6		MS-8		ES-8	
tratamentos	conc. proteína (ug/ μL)	ativ. anticoag. (seg.)	conc. proteína (ug/ μL)	ativ. anticoag. (seg.)	conc. proteína (ug/ μL)	ativ. anticoag. (seg.)	conc. proteína (ug/ μL)	ativ. anticoag. (seg.)	conc. proteína (ug/ μL)	ativ. anticoag. (seg.)
controle	2.90 $\pm 0,37$	352.14 $\pm 59,70$	1.15 $\pm 0,12$	285.83 $\pm 40,96$	1.07 $\pm 0,22$	207.50 $\pm 28,16$	0.75 $\pm 0,17$	207.50 $\pm 10,14$	1.13 $\pm 0,28$	15.00 $\pm 5,45$
serotonina 1 μM	2.72 $\pm 0,27$	241.67 $\pm 53,72$	1.26 $\pm 0,17$	151.67 $\pm 54,19$	1.22 $\pm 0,21$	281.67 $\pm 11,67$	1.35 $\pm 0,25$	103.33 $\pm 27,44$	2.18 $\pm 0,56$	33.33 $\pm 13,64$
serotonina 5 μM	2.90 $\pm 0,26$	220.00 $\pm 34,88$	1.39 $\pm 0,44$	122,50 *	0.81 $\pm 0,29$	73,33 *	0.42 $\pm 0,12$	47.50 $\pm 2,50$	0.43 $\pm 0,20$	10.00 $\pm 4,08$
β ecdisona 1 μM	2.23 $\pm 0,36$	206.67 $\pm 34,8$	1.24 $\pm 0,29$	183.33 $\pm 40,96$	0.89 $\pm 0,47$	82,50 *	0.70 $\pm 0,27$	40.00 $\pm 13,54$	0.48 $\pm 0,35$	32.50 $\pm 19,74$

A análise dos MSs e ESs por SDS-PAGE (Fig. 20 A e B) aparentemente sugere que o tratamento com hormônio serotonina $1,0 \mu\text{M}$ não modificou o perfil quando comparado ao do controle dos cultivos de mesma idade. A principal diferença nas amostras de MS foi o maior número e intensidade das bandas no segundo dia de cultivo em relação aos demais, sobretudo ao oitavo dia (Fig. 20 A e B). Embora os perfis obtidos das amostras de MS e ES sejam semelhantes, algumas bandas, entretanto, parecem estar comparativamente mais evidentes no MS do segundo dia (~ 29 e 23 kDa) (Fig. 20 A), já a banda de ~ 50 kDa parece ser mais abundante no ES (Fig. 20 B).

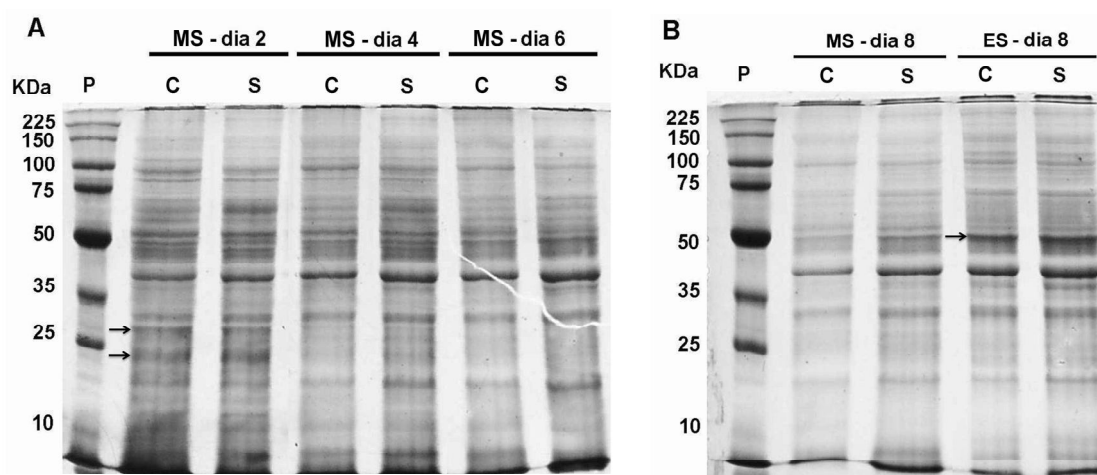


Figura 20: SDS-PAGE a 10% do material secretado (MS) e extrato solúvel (ES) dos cultivos de intestino médio anterior de *Triatoma brasiliensis* tratados com serotonina a $1 \mu\text{M}$ (S) e não tratados (controle) (C). A: MS dos dias 2, 4 e 6; B: MS e ES do dia 8. As colunas do gel possuem $10 \mu\text{L}$ de um pool de quatro amostras de cada dia de cultivo e do extrato de células. As setas (\rightarrow) indicam as bandas de ~ 29 kDa e ~ 23 kDa característica das amostras de MS e ~ 50 kDa característica de ES. P: padrão de peso molecular.

5.2.3.2 Cultivos de *T. infestans*

5.2.3.2.1 Efeito da suplementação do meio no cultivo de intestino médio anterior

A quantificação de proteínas (Fig. 21 A) e a atividade anticoagulante (Fig. 21 B) das amostras de MS foram monitoradas a cada dois dias até o décimo dia de cultivo com ou sem a suplementação do meio de cultura com nutrientes e fator de crescimento, meio 1 e meio 2, respectivamente. A amostra de ES nestas mesmas condições de cultivo foi analisada apenas no dia 10.

De maneira geral, as amostras de MS provenientes de cultivos preparados com o meio 1 ou com meio 2 apresentaram quantidade de proteínas semelhantes com pequenas oscilações ao longo do tempo (Fig. 21 A). A quantidade de proteína da amostra de MS cultivada com meio 1 foi maior do que a cultivada em meio 2 apenas no dia 8 (teste t, $p < 0,05$). Já quanto a atividade anticoagulante (Fig. 21 B), ambas apresentaram um perfil semelhante, com maior atividade no dia 2. Na comparação entre os MSs (Fig. 21 B), a atividade do MS cultivado com meio 1 foi maior em relação ao cultivado com meio 2 nos dias 2 e 4 (teste t, $p < 0,05$). A comparação dos ESs do dia 10 apresentou quantidade de proteína e atividade anticoagulante semelhante nos dois meios testados (teste t, N.S.) (Fig. 21 A e B).

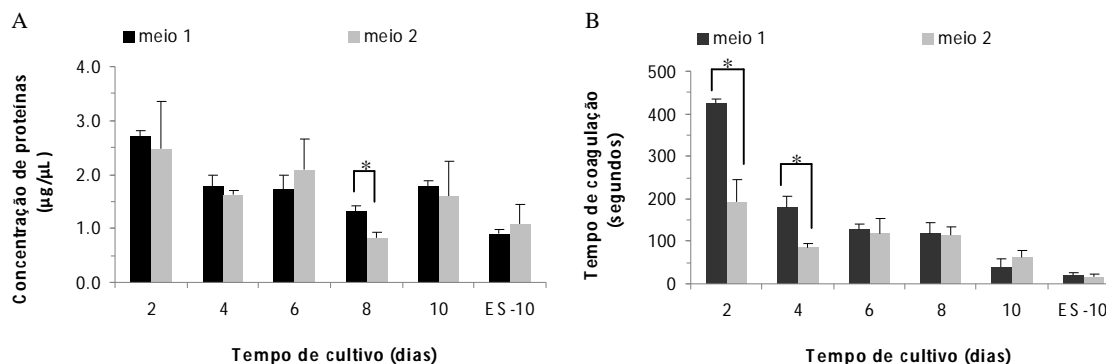


Figura 21: Concentração de proteínas (A) e atividade anticoagulante (B) do material secretado (MS) e extrato solúvel do dia 10 (ES-10) dos cultivos de intestino médio anterior de *Triatoma infestans* cultivados em meio 1 ou meio 2. As barras representam o erro padrão de três amostras. O asterisco (*) indica diferença estatística entre duas amostras pelo teste t ($p < 0,05$).

5.2.3.2.2 Adição de serotonina e β ecdisona no cultivo de intestino médio anterior

A quantificação de proteínas, a atividade anticoagulante e a atividade lisozímica (Fig. 22, Tab. II e Tab. III) das amostras de MS foram monitoradas a cada dois dias até o décimo quarto dia de cultivo com ou sem adição de serotonina (0,1 e 1,0 μ M) ou β ecdisona (0,1 e 1,0 μ M). A adição destes hormônios foi realizada juntamente com o meio 1 fresco nas trocas de meio a cada dois dias ou adicionado apenas no dia de preparo da cultura (1x). A amostra de ES destes mesmos grupos experimentais foi coletada apenas no dia 14.

O perfil obtido no monitoramento da quantidade de proteínas (Fig. 22 A), atividade anticoagulante (Fig. 22 C) e atividade lisozímica (Fig. 22 E) das amostras de MS de cultura tratadas com serotonina foram semelhantes ao perfil do grupo controle. A única diferença estatística encontrada em relação ao grupo controle foi no MS do dia 10 do cultivo tratado apenas no momento da semeadura (1X) com serotonina à 1 μ M para a atividade lisozímica (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$) (Tab. II).

Já o perfil obtido no monitoramento da quantidade de proteína (Fig. 22 B), atividade anticoagulante (Fig. 22 D) e atividade lisozímica (Fig. 22 F) das amostras de MS de cultura tratadas com β ecdisona mostraram um perfil distinto do perfil do grupo controle, sobretudo na quantidade de proteína no dia 6 e na atividade anticoagulante no dia 2 com relação a todos os tratamentos. A atividade anticoagulante no dia 2 e a quantidade de proteína no dia 6 nas amostras de MS tratadas com β ecdisona foi menor do que as do grupo controle (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$) (Tab. III).

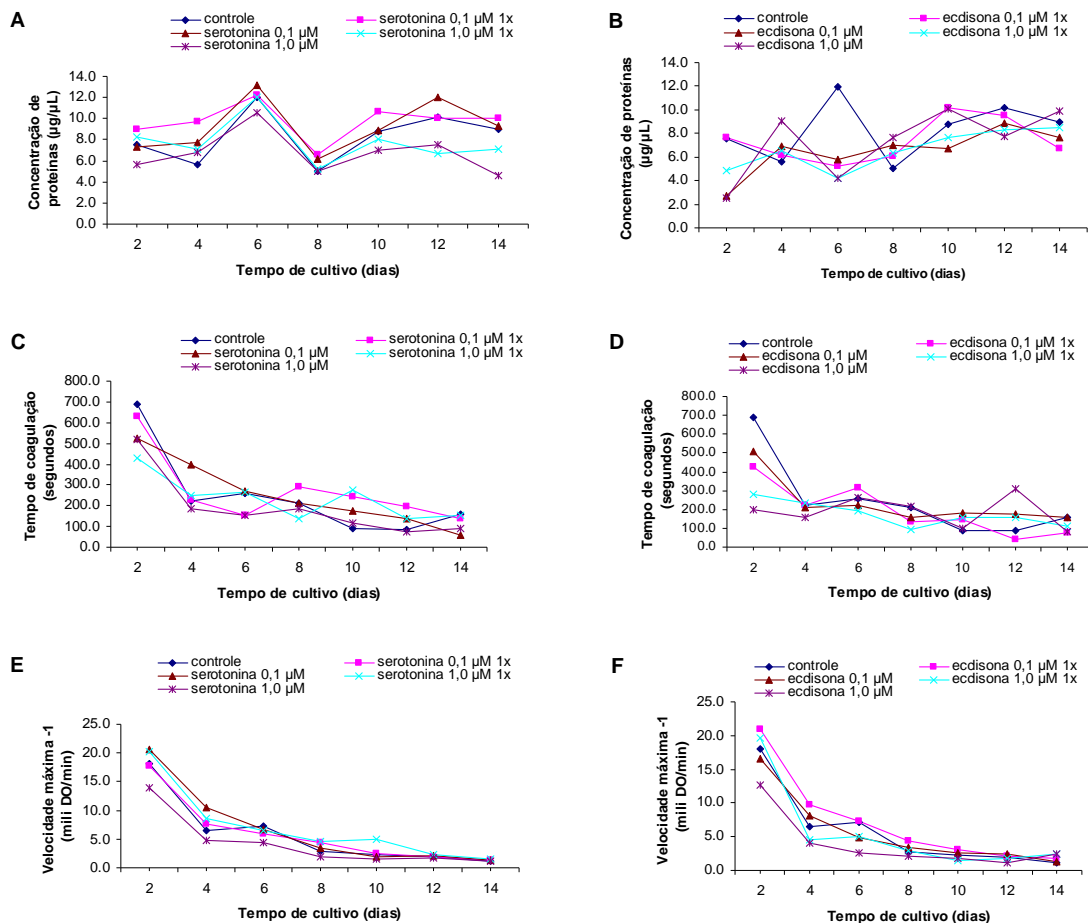


Figura 22: Concentração de proteínas (A e B), atividade anticoagulante (C e D) e atividade lisozímica (E e F) do material secretado (MS) dos cultivos de intestino médio anterior de *Triatoma infestans* dos grupos controle, tratados com serotonina a 0,1 e 1,0 µM e β ecdisona 0,1 e 1,0 µM adicionado apenas no momento da sementeira (1x) ou no momento da sementeira e a cada troca de meio. Cada ponto representa a média de quatro amostras.

Tabela II: Estimativa da concentração de proteínas, atividade anticoagulante e atividade lisozímica do material secretado (MS) e do extrato solúvel (ES) do décimo quarto dia de cultivo de intestino médio anterior de *Triatoma infestans* não tratados (controle) e tratados com serotonina (0,1 e 1,0 µM) adicionado só no momento da semeadura (1x) ou no momento da semeadura e a cada troca de meio. Os valores da tabela representam a média de quatro amostras seguido do erro padrão. O asterisco (*) indica diferença estatística entre o controle e cada grupo tratado com os hormônios em questão (ANOVA/Tukey, p<0,05).

dia/amostra	MS-2			MS-4			MS-6			MS-8		
tratamentos	conc. proteína (ug/µL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)	conc. proteína (ug/µL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)	conc. proteína (ug/µL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)	conc. proteína (ug/µL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)
controle	7.53 ± 0,36	691.33 ± 76,71	18.07 ± 2,64	5.63 ± 0,88	224.67 ± 74,58	6.51 ± 0,93	11.98 ± 0,343	258.88 ± 69,35	7.19 ± 0,60	5.05 ± 0,48	212.25 ± 32,73	2.80 ± 0,66
serotonina 0,1 µM (1x)	8.96 ± 1,01	629.58 ± 59,21	17.83 ± 1,62	9.67 ± 1,14	228.25 ± 52,02	7.62 ± 2,09	12.19 ± 0,57	153.00 ± 35,51	5.84 ± 2,03	6.61 ± 1,09	289.38 ± 57,03	4.44 ± 1,29
serotonina 0,1 µM	7.30 ± 0,42	526.09 ± 51,15	20.59 ± 0,89	7.75 ± 0,78	396.83 ± 23,18	10.47 ± 2,03	13.15 ± 0,99	272.50 ± 50,78	6.70 ± 1,33	6.17 ± 0,55	209.75 ± 15,47	3.37 ± 0,49
serotonina 1,0 µM (1x)	8.24 ± 1,14	431.11 ± 45,48	20.29 ± 2,30	7.11 ± 1,67	251.50 ± 62,52	8.67 ± 0,60	12.00 ± 1,33	265.00 ± 19,52	6.50 ± 1,55	5.26 ± 0,98	136.50 ± 31,18	4.67 ± 1,19
serotonina 1,0 µM	5.67 ± 0,73	519.39 ± 75,10	13.91 ± 2,46	6.78 ± 1,24	187.88 ± 25,59	4.78 ± 1,93	10.57 ± 1,07	151.50 ± 40,66	4.33 ± 0,64	5.01 ± 1,34	187.33 ± 32,53	1.92 ± 0,25

dia/amostra	MS-10			MS-12			MS-14			ES-14		
tratamentos	conc. proteína (ug/µL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)	conc. proteína (ug/µL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)	conc. proteína (ug/µL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)	conc. proteína (ug/µL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)
controle	8.77 ± 1,69	90.50 ± 19,08	2.29 ± 0,42	10.15 ± 1,51	87.00 ± 14,93	1.89 ± 0,42	8.97 ± 1,17	159.67 ± 42,76	1.09 ± 0,24	0.97 ± 0,11	17.50 ± 10,11	1.13 ± 0,07
serotonina 0,1 µM (1x)	10.70 ± 1,49	245.50 ± 43,36	2.51 ± 0,62	10.04 ± 1,42	197.25 ± 19,57	1.93 ± 0,49	10.05 ± 1,31	140.00 ± 22,21	1.39 ± 0,31	0.20 ± 0,13	20.38 ± 15,91	0.91 ± 0,12
serotonina 0,1 µM	8.83 ± 1,78	177.17 ± 86,89	1.87 ± 0,56	12.03 ± 1,42	135.83 ± 9,17	2.08 ± 0,42	9.32 ± 1,87	58.00 ± 44,56	1.42 ± 0,10	0.61 ± 0,28	1.38 ± 1,38	0.90 ± 0,04
serotonina 1,0 µM (1x)	8.01 ± 2,25	278.00 ± 78,97	4,96 * ± 0,58	6.71 ± 1,66	139.50 ± 83,59	2.23 ± 1,24	7.15 ± 1,94	152.83 ± 60,73	1.52 ± 0,34	1.75 ± 0,38	61.83 ± 14,17	1.27 ± 0,40
serotonina 1,0 µM	7.01 ± 2,05	114.50 ± 43,27	1.58 ± 0,61	7.55 ± 1,11	73.25 ± 38,29	1.69 ± 0,49	4.63 ± 0,29	88.25 ± 13,44	1.09 ± 0,10	1.30 ± 0,78	5.13 ± 1,99	0.98 ± 0,36

Tabela III: Estimativa da concentração de proteínas, atividade anticoagulante e atividade lisozímica do material secretado (MS) e do extrato solúvel (ES) do décimo quarto dia de cultivo de intestino médio anterior de *Triatoma infestans* não tratados (controle) e tratados com β ecdisona (0,1 e 1,0 μ M) adicionado só no momento da semeadura (1x) ou no momento da semeadura e a cada troca de meio. Os valores da tabela representam a média de quatro amostras seguido do erro padrão. O asterisco (*) indica diferença estatística entre o controle e cada grupo tratado com os hormônios em questão (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$).

dia/amostra	MS-2			MS-4			MS-6			MS-8		
tratamentos	conc. proteína (ug/μL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)	conc. proteína (ug/μL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)	conc. proteína (ug/μL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)	conc. proteína (ug/μL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)
controle	7.53 ± 0,36	691.30 ± 76,71	18.07 ± 2,64	5.63 ± 0,88	224.67 ± 74,58	6.51 ± 0,929	11.98 ± 0,34	258.88 ± 69,35	7.19 ± 0,60	5.05 ± 0,48	212.25 ± 32,73	2.80 ± 0,66
β ecdisona 0,1 μ M (1x)	7.69 ± 0,98	426,4 * ± 32,32	20.99 ± 1,23	6.17 ± 0,56	221.25 ± 25,35	9.67 ± 0,38	5,259 * ± 1,20	317.50 ± 41,45	7.28 ± 2,05	6.02 ± 0,91	135.75 ± 29,41	4.31 ± 0,80
β ecdisona 0,1 μ M	2,68 * ± 0,96	507,40 * ± 45,31	16.52 ± 2,28	6.90 ± 0,87	210.75 ± 30,08	8.05 ± 1,97	5,76 * ± 0,44	222.25 ± 29,74	4.82 ± 0,79	7.02 ± 0,20	154.75 ± 25,52	3.41 ± 0,40
β ecdisona 1,0 μ M (1x)	4.88 ± 1,78	279,20 * ± 71,43	19.63 ± 3,6	6.51 ± 0,88	232.38 ± 14,18	4.54 ± 1,65	4,20 * ± 0,49	191.00 ± 20,83	5.02 ± 1,15	6.37 ± 1,04	94.75 ± 20,39	2.85 ± 0,63
β ecdisona 1,0 μ M	2,54 * ± 0,41	199,30 * ± 56,19	12.62 ± 2,11	9.09 ± 0,70	158.00 ± 35,01	4.10 ± 1,36	4,17 * ± 0,54	261.88 ± 33,86	2.63 ± 0,44	7.67 ± 0,76	218.25 ± 56,83	2.10 ± 0,43

dia/amostra	MS-10			MS-12			MS-14			ES-14		
tratamentos	conc. proteína (ug/μL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)	conc. proteína (ug/μL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)	conc. proteína (ug/μL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)	conc. proteína (ug/μL)	ativ. anticoag. (seg.)	ativ. lisoz. (miliDO/min)
controle	8.77 ± 1,69	90.50 ± 19,08	2.29 ± 0,42	10.15 ± 1,51	87.00 ± 14,93	1.89 ± 0,42	8.97 ± 1,17	159.67 ± 42,76	1.09 ± 0,24	0.97 ± 0,11	17.50 ± 10,11	1.13 ± 0,07
β ecdisona 0,1 μ M (1x)	10.13 ± 3,20	147.63 ± 79,47	3.14 ± 0,53	9.55 ± 2,75	42.00 ± 27,41	2.18 ± 0,35	6.75 ± 0,90	73.63 ± 57,06	1.79 ± 0,27	0.32 ± 0,12	43.50 ± 13,25	0.96 ± 0,11
β ecdisona 0,1 μ M	6.73 ± 1,77	182.00 ± 71,48	2.57 ± 0,71	8.90 ± 1,67	174.63 ± 72,02	2.37 ± 0,81	7.65 ± 0,84	159.50 ± 73,61	1.29 ± 0,42	0.87 ± 0,49	18.25 ± 10,73	0.79 ± 0,16
β ecdisona 1,0 μ M (1x)	7.63 ± 1,94	160.50 ± 37,91	1.51 ± 0,27	8.35 ± 0,40	156.33 ± 7,88	1.76 ± 0,29	8.51 ± 0,67	112.75 ± 34,65	2.43 ± 0,22	0.60 ± 0,38	4.63 ± 4,63	1.15 ± 0,08
β ecdisona 1,0 μ M	10.07 ± 1,41	96.75 ± 23,57	1.72 ± 0,40	7.71 ± 0,74	308.33 ± 62,36	1.20 ± 0,22	9.92 ± 0,49	83.67 ± 2,96	2.42 ± 0,83	0.28 ± 0,21	22.75 ± 16,89	1.37 ± 0,44

5.2.4 Viabilidade celular dos cultivos primários de intestino médio anterior de *T. brasiliensis* e *T. infestans*

No teste de viabilidade celular realizado tanto com cultivos de *T. brasiliensis* quanto de *T. infestans* com ou sem adição de hormônios foi observado que grande parte das células morrem ao longo do período de cultivo. A quantidade de células vivas/mortas foi semelhante para os cultivos tratados ou não tratados com hormônios ao se comparar culturas de mesmo tempo de cultivo para as duas espécies de triatomíneos estudadas.

De maneira geral, no dia 2 (Fig. 23 A e B) praticamente não há células mortas e no dia 4 estas começam a aparecer (Fig. 23 C e D). Já no dia 8 (Fig. 23 E e F) e 14 (Fig. 23 G e H) as células mortas são a maioria.

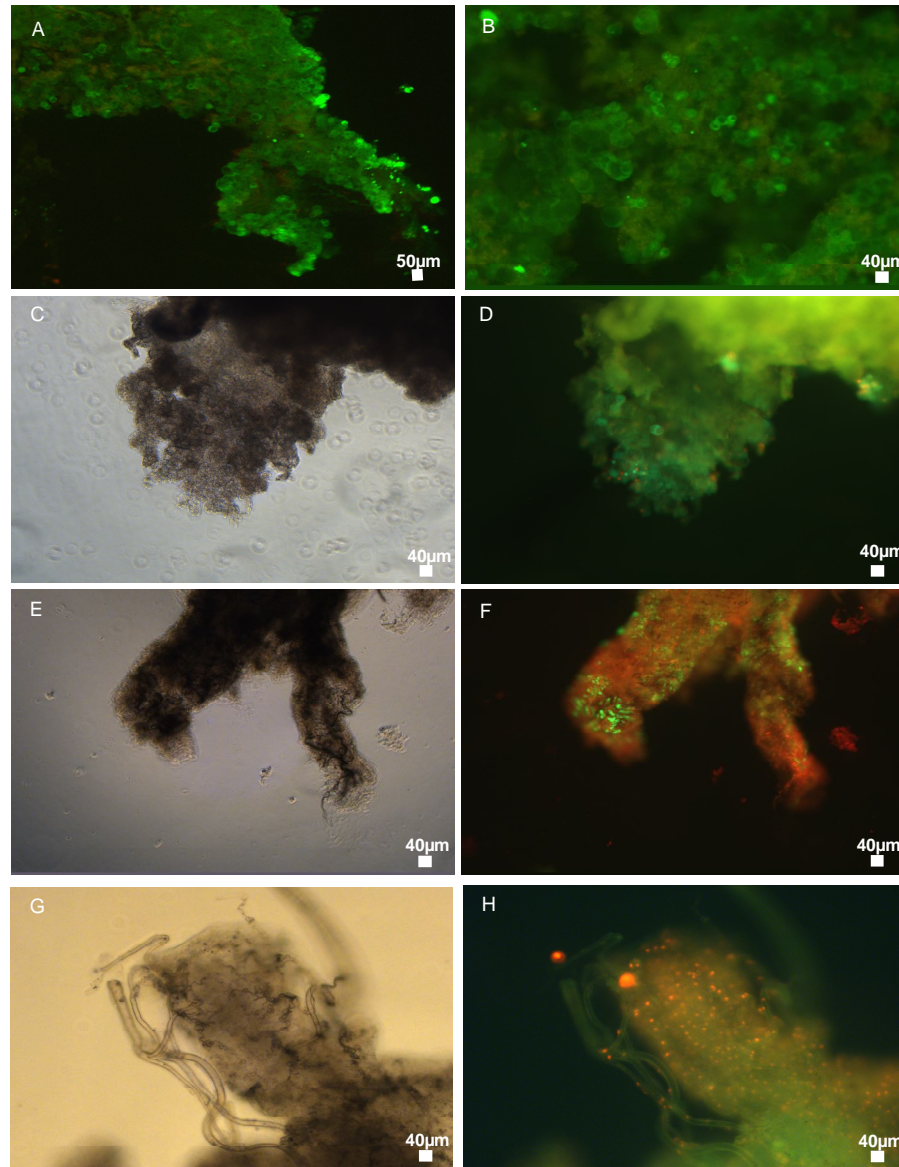


Figura 23: Cultivos de intestino médio anterior de *Triatoma infestans* cultivados com meio 1 (meio Schneider suplementado com nutrientes e fator de crescimento) corados pelo kit Live/Dead Viability/Citotoxicity (Molecular Probes®). Coloração verde representa célula viva e vermelha célula morta. Fig. A e B correspondem ao dia 2 de cultivo, Fig. C e D ao dia 4 de cultivo, Fig. E e F ao dia 8 de cultivo, Fig. G e H ao dia 14 de cultivo. Fig. C, E e G correspondem a imagens por contraste de fase das culturas e Fig. D, F e H imagens correspondentes a essas para análise de fluorescência.

6 DISCUSSÃO

6.1 Cultivo de glândula salivar e canal salivar de *R. prolixus*

De forma geral, os resultados mostram que é possível cultivar glândula salivar e canal salivar de *R. prolixus in vitro*. A detecção de proteínas salivares com atividade biológica no sobrenadante, ao longo do tempo, sugeriu que o cultivo possui capacidade de produzir e secretar proteínas bioativas durante os 30 dias do cultivo. Estes resultados corroboram os achados de Marshall (1982), que manteve por 35 dias glândulas salivares de *T. protracta* à 28°C em tubos de polietileno de 1,5 mL contendo meio de cultura para inseto Grace e relata que a quantidade de proteínas produzidas foi constante ao longo de todo o período de cultivo. Segundo Marshall (1982), os sobrenadantes coletados de diferentes dias de cultivo foram injetados intradermicamente em voluntários humanos que desencadearam reações (inchaço e eritema) semelhantes às produzidas pela picada de *T. protracta*.

No cultivo de células de glândula salivar observamos a presença de três tipos celulares, sendo as células binucleadas (do tipo II) o tipo mais abundante. Estudos prévios sugerem que as células binucleadas podem ser as responsáveis pela produção e secreção de saliva, uma vez que possuem grande massa nuclear, típica de células com elevada atividade, necessária para uma rápida e regular regeneração celular após a secreção da saliva no lúmen da glândula (BARTH, 1954; ANHÊ e AZEVEDO-OLIVEIRA, 2008).

Curiosamente as células do tipo I, migraram do explante para o entorno deste e permaneceram em cultura por 15 dias. Essas células parecem se comportar como fibroblastos, uma vez que são capazes de migrar e apresentam formato alongado (SONG *et al.*, 2010). Provavelmente estão relacionadas à função estrutural na glândula salivar.

As células do tipo III foram menos abundantes. O fato de serem células pouco numerosas e com morfologia diferente das demais, apresentando-se uninucleadas e com formato arredondado, sugere que estas células possuam função distinta dos demais tipos celulares. Uma suposta função é que as células do tipo III apresentem alguma atividade que exija baixo metabolismo ou ainda que estas células podem se transformar em células binucleadas, ou seja, elas teriam uma função regenerativa do tecido glandular.

Os resultados para o cultivo de canal salivar mostraram que as células foram capazes de permanecer em cultura por 30 dias quando o canal foi cultivado inteiro, pois as células se mostraram sensíveis aos dois tratamentos enzimáticos (tripsina e colagenase). Isso impossibilitou o cultivo do canal salivar com desagregação das células pela utilização de enzimas. A presença de grânulos de secreção ao redor das células do canal salivar é um dado

novo e sugere que as células estavam metabolicamente ativas e provavelmente possuam outras funções e não apenas o papel de conduzir a saliva para as peças bucais do inseto. O canal salivar pode estar envolvido na produção e secreção de substâncias que participam da ativação de proteínas salivares (AMINO *et al.*, 2002) ou na suplementação da saliva com outras proteínas.

A quantificação de proteínas indicou que o canal salivar produziu e secretou moléculas no sobrenadante até o fim do cultivo. Este resultado está de acordo com a presença dos grânulos secretores visualizados nas células do canal salivar em cultura. Estas moléculas não foram visualizadas no SDS-PAGE e não tiveram atividades anticoagulante e apirásica. Provavelmente, elas possuem peso molecular fora da resolução do PAGE 15% (maiores do que 66 kDa) e atividades diferentes daquelas relacionadas a inibição da hemostasia. Outra explicação seria a baixa concentração dos componentes secretados pelo canal ou mesmo por apresentaram uma composição não-protéica.

Quanto à detecção de atividades biológicas nas amostras de sobrenadante de glândula salivar, observou-se que estas foram maiores nos primeiros dias. Isso pode estar relacionado com o estado de atividade das células deste órgão que teria sofrido redução com o passar do tempo, provavelmente devido à falta de estímulos no meio (como, por exemplo, hormônios). Estudos prévios de fisiologia da glândula salivar de *T. infestans* relataram que as células glandulares entram em estado de inatividade cerca de 10-14 dias após alimentação do inseto. Cinco minutos após alimentação, as células da glândula salivar estão em plena atividade caracterizada pelo aumento em número, produtos de secreção e regeneração protoplasmática e, após 12-14 horas, parte da glândula começa a ter sua atividade diminuída (BARTH, 1954). Esta descrição vai de encontro com nossos resultados onde a maior quantidade de proteínas ativas observadas no sobrenadante de cultura ocorreu nos primeiros dias de cultivo e que a maioria das células estavam aderidas na placa de cultura quando o cultivo foi realizado com glândulas salivares isoladas de triatomíneos 24 horas pós-alimentação.

O perfil eletroforético (SDS-PAGE) apresentou fortes bandas com peso molecular entre 15 e 25 kDa sugerindo que as culturas estavam produzindo majoritariamente moléculas da família das lipocalinas. As lipocalinas são as principais moléculas presentes nas glândulas salivares do *R. prolixus* e possuem peso molecular aproximado de 20 kDa (MONTFORT *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2004). A possível presença de lipocalinas nas culturas sugere que a produção *in vitro* parece ser qualitativamente semelhante à produção de proteínas salivares *in vivo*. Este fato é reforçado pela presença de atividade anticoagulante que, em *R. prolixus*, é

devido a presença de uma lipocalina denominada nitroforina 2 (CHAMPAGNE *et al.*, 1995; RIBEIRO *et al.*, 1995).

A presença de soro fetal bovino prejudicou a análise qualitativa das proteínas produzidas pela glândula salivar através do SDS-PAGE. Proteínas presentes no soro fetal bovino, sobretudo a grande quantidade de soro albumina bovina (que possui aproximadamente 66 kDa), impediu a visualização de proteínas com peso molecular acima deste valor.

A quantidade de proteínas encontradas no sobrenadante das culturas pode indicar que as células estavam produzindo e secretando proteínas para o meio, pois a maioria das células permaneceu viva durante o tempo de acompanhamento dos cultivos de acordo com o teste de viabilidade celular.

6.2 Cultivo de intestino médio anterior de *T. brasiliensis* e *T. infestans*

A detecção de proteínas intestinais no material secretado (MS) e no extrato solúvel (ES) do cultivo de intestino médio anterior de *T. brasiliensis*, ao longo do tempo, sugere que houve liberação para o meio de proteínas com atividade biológica durante os 8 dias de cultivo. A atividade anticoagulante, tanto no MS quanto no ES, apresentou-se decrescente ao longo do tempo, enquanto a quantidade de proteínas, principalmente no ES, oscilou entre os dias 4 e 8.

A quantidade de proteínas encontradas no ES de *T. brasiliensis* foi semelhante à observada no MS nos dias de cultivo analisados. Por outro lado, a atividade anticoagulante do MS foi sempre maior que a atividade presente no ES. Estes resultados sugerem que as proteínas com atividades antihemostáticas estavam sendo produzidas e secretadas no MS, sobretudo nos primeiros dias de cultivo. A diferença entre quantidade de proteínas e atividade anticoagulante no ES apenas reflete a maior quantidade de proteínas de metabolismo interno nesta amostra do que de proteínas anticoagulantes. Por outro lado, as moléculas encontradas no MS eram, provavelmente, de proteínas secretadas relacionadas com as atividades encontradas no lúmen do intestino médio anterior. Entretanto, não podemos descartar a presença de proteínas de metabolismo interno que foram para o MS após a morte e ruptura celular, principalmente nos cultivos mais velhos. Estes resultados estão de acordo com o teste de viabilidade celular que mostrou que as células morrem progressivamente ao longo do tempo de cultivo e, conseqüentemente, produzem cada vez menos proteínas anticoagulantes.

No perfil de bandas do MS e ES de *T. brasiliensis* no SDS-PAGE observou-se a presença de proteínas de diferentes pesos moleculares. Os perfis obtidos do MS e ES foram semelhantes, o que sugere que o MS possui proteínas citoplasmáticas que foram liberadas

após o rompimento celular. Apesar do curto tempo de viabilidade do intestino médio anterior nas condições de cultivo primário utilizado no presente trabalho, foi possível obter uma melhor definição das bandas na eletroforese dos cultivos quando comparado com o material solúvel obtido diretamente de insetos dissecados. Isso ocorreu, provavelmente, porque os intestinos foram lavados antes de serem cultivados e os MSs ficaram livres de hemoglobina, albumina e outras proteínas sanguíneas provenientes do hospedeiro vertebrado. Isto facilita consideravelmente o estudo das proteínas intestinais e identificação das bandas pelo peso molecular.

Quando se comparou o cultivos de intestino médio anterior de *T. infestans* realizados com meio 1 ou meio 2 observou-se que os cultivos realizados com o primeiro apresentaram, de maneira geral, maior quantidade de proteínas e de atividade anticoagulante, principalmente nos primeiros dias de cultivo. Estes resultados sugerem que os nutrientes e fator de crescimento adicionados ao meio 1 estimularam os cultivos e aumentaram a produção e secreção de proteínas com atividade biológica.

A mudança da espécie de triatomíneo nos ensaios de intestino médio anterior deveu-se exclusivamente a uma queda considerável no número de espécimes da colônia de *T. brasiliensis*, o que nos levou a continuar os experimentos com *T. infestans*.

6.3 Influência de hormônios na cultura primária de intestino médio anterior de triatomíneos

Sabe-se que a coordenação do processo alimentar dos triatomíneos é complexa e está associada tanto com sinais internos quanto externos (ORCHARD, 2006). Acredita-se que, em larvas de Coleoptera (*Rhynchophorus ferrugineus*), hormônios produzidos por células intestinais estão envolvidos no processo de manutenção de pHs adequados a cada porção do tubo digestivo (SUNITHA *et al.*, 1999). Além disso, Harshini e colaboradores (2002) observaram que neuropeptídeos produzidos por insetos (análogos a hormônios envolvidos com a digestão em vertebrados) tem efeito sobre a produção e a liberação de enzimas no intestino de larvas de *Opisina arenosella* (Lepidoptera). Daí a importância de se investigar o efeito de hormônios no intestino médio anterior de triatomíneos, que podem estar envolvidos na regulação da produção e secreção de enzimas digestivas no intestino destes insetos.

A serotonina possui função de regular as atividades alimentares de vários invertebrados, entre eles os triatomíneos (LONG e MURDOCK, 1983; LENT e DICKINSON, 1988; NÄSSEL, 1988; KAUFMANN *et al.*, 2004). Este hormônio também pode estimular a respiração celular, elevando o consumo de oxigênio e liberação de gás

carbônico no meio, acidificando, de acordo com Schewe e colaboradores (2008) e Rein e colaboradores (2006), as glândulas salivares de Calliphoridae.

Já estudos com cultura de células *mbn2* (hemócitos de larva de *Drosophila melanogaster*) cultivadas em meio Schneider (Sigma) acrescidas com 1 μ M de ecdisona demonstraram que este hormônio induz o aumento da expressão gênica de peptídeoglicanos antimicrobianos nestas células (ZHANG e PALLI, 2009). Em outros grupos de insetos, por outro lado, a presença de ecdisona parece aumentar o processo de apoptose em células de Lepidoptera (*Plodia interpunctella*) denominadas IAL-PID2 (LALOUETTE *et al.*, 2010).

Como os hormônios atuam regulando o metabolismo celular em praticamente todos os tecidos dos insetos resolvemos investigar a importância do efeito da serotonina e da ecdisona nos cultivos primários de intestino médio anterior de triatomíneos, pois provavelmente estes dois hormônios estão envolvidos na regulação da produção de moléculas bioativas desta região intestinal.

Primeiramente testamos a influência destes dois hormônios em cultivos de intestino médio anterior utilizando meio Schneider sem suplementação por nutrientes (meio 2) de *T. brasiliensis* por 8 dias. A comparação da quantidade de proteína e atividade biológica (anticoagulante) dos MSs de cultivos tratados com hormônio (serotonina ou β ecdisona) e não tratados (controle) não foram conclusivos. Desta forma, resolvemos testar a influência destes hormônios em cultivos de intestino de *T. infestans* com meio Schneider suplementado com nutrientes (meio 1) durante um período maior de tempo (14 dias).

A adição de β ecdisona nos cultivos intestinais de *T. infestans* alterou o perfil protéico e de atividade anticoagulante em relação ao controle (sem adição de hormônio), sugerindo uma ação inibidora sobre a produção de biomoléculas intestinais. Isso pode estar relacionado com sinalização para o processo de muda do inseto, que desviaria a maquinaria do intestino (como de outros órgãos) para expressão de proteínas envolvidas no processo de metamorfose em detrimento a outros processos, como os relacionados com a hematofagia. Já a adição de serotonina aparentemente não alterou o perfil protéico e nem das atividades anticoagulante e lisozímica.

Entretanto, no teste de viabilidade celular detectamos que a maioria das células intestinais, tanto de *T. infestans* quanto de *T. brasiliensis* encontravam-se mortas no oitavo dia de cultivo. A curta sobrevivência do intestino médio anterior nas condições de cultivo utilizadas no presente trabalho provavelmente dificultou o estudo da influência hormonal sobre a atividade das células intestinais.

A maioria das células intestinais dos insetos são os enterócitos, porém, há também células basais que incluem as endócrinas e as regenerativas (HECKER, 1977; HOUK, 1977; BILLINGSLEY, 1990; OKUDA *et al.*, 2002). A apoptose ocorre normalmente em alguns enterócitos de insetos após a alimentação sanguínea (OKUDA *et al.*, 2007). Em *Culex quinquefasciatus* foi observado que células apoptóticas são ejetadas para o lúmen do intestino médio e as células basais de regeneração se diferenciam para reparar a perda de células digestivas. O número de células regenerativas diminui após cada repasto sanguíneo, porém o mecanismo de regulação da apoptose e diferenciação de células regenerativas no intestino médio de mosquitos não é muito bem entendido (OKUDA *et al.*, 2007). Em nosso trabalho, provavelmente por falta de algum estímulo (como, por exemplo, a ausência de sangue em contato com as células do intestino) as células regenerativas não substituíram as células intestinais que foram morrendo, levando à morte progressiva das células ao longo do tempo de cultivo.

Outra variável a se considerar que pode ter interferido nos resultados de atividade obtidos com os tratamentos hormonais pode ter relação com o tempo de repasto dos insetos utilizados. De acordo com Araujo e colaboradores (2006a), há diferença no nível de expressão gênica no intestino médio anterior em ninfas de quinto estágio de *T. brasiliensis* com relação à enzima lisozima. Insetos não alimentados apresentaram níveis menores de lisozima em relação a insetos um dia após alimentação. Esta taxa aumentou com o passar do tempo do repasto, tendo um pico máximo cinco dias após a alimentação e, a partir daí, a expressão desta proteína sofreu uma leve redução, mantendo-se em baixos níveis no intestino médio anterior deste triatomíneo (ARAUJO *et al.*, 2006a). Quanto ao pH, não se sabe qual é o ideal para a ação da lisozima. De acordo com Barros e colaboradores (2009), o pH no lúmen do intestino médio anterior de *T. brasiliensis* é de cerca de 7,16 durante as primeiras 24 horas após repasto sanguíneo e praticamente continua sem alteração após este período (pH $7,02 \pm 0,05$). Este pH encontrado no intestino médio anterior de triatomíneo está condizente com o utilizado por nós nos cultivos (pH 7), não sendo, provavelmente, o fator que interferiu na baixa taxa metabólica deste órgão nos nossos experimentos.

Levando em consideração as células vivas e mortas identificadas no teste de viabilidade celular, observamos que o tempo de vida das células intestinais nas condições estudadas é de cerca de seis dias, pois cultivos de seis dias ainda apresentaram uma taxa significativa de proteínas com atividade no MS dos cultivos de intestino médio anterior dos triatomíneos.

Os nossos resultados mostraram que a metodologia empregada na obtenção e/ou manutenção dos cultivos de intestino médio anterior não funcionaram adequadamente, resultando em baixas taxas de produção de proteínas bioativas e na curta sobrevivência das células. Estes resultados podem estar relacionados à falta de estímulo proporcionado pelo próprio alimento no intestino do inseto e/ou à falta de estímulos hormonais como os neuropeptídeos produzidos por insetos ou mesmo pela flora bacteriana normal do intestino. Várias outras condições e reagentes devem ser testadas a fim de otimizar os cultivos.

Entretanto, o fato das células produzirem biomoléculas intestinais, faz com que este sistema de cultivo *in vitro* se constitua num modelo de estudo promissor para se verificar a influência destas moléculas no desenvolvimento e multiplicação do *T. cruzi* e *T. rangeli* quando estas são adicionadas às culturas destes protozoários. Isso porque o desenvolvimento e multiplicação, tanto de *T. cruzi* quanto do *T. rangeli*, ocorrem inicialmente no intestino médio anterior dos triatomíneos.

7 CONCLUSÕES

- A glândula salivar e o canal salivar principal de *R. prolixus* podem ser mantidos por mais de 30 dias em cultura primária, apresentando a maioria de suas células viáveis.
- A glândula salivar de *R. prolixus* quando cultivada *in vitro* apresenta 3 tipos celulares, sendo tipo I (célula fusiforme uninuclear), tipo II (célula globosa e binucleada) e tipo III (célula globosa uninuclear).
- Os canais salivares de *R. prolixus*, quando cultivados *in vitro*, apresentam vesículas de secreção próximas às células, que podem indicar que o canal possui papel secretório.
- Os cultivos primários de glândula salivar de *R. prolixus* secretam moléculas bioativas no sobrenadante sendo sua atividade maior nos primeiros dias de cultivo.
- O intestino médio anterior de *T. brasiliensis* e *T. infestans* podem ser mantidos em cultura primária, porém o tempo ideal de vida das células intestinais nas condições estudadas foi de cerca de 6 dias, quando ainda se tem uma quantidade considerável de células vivas.
- As células intestinais de *T. brasiliensis* e *T. infestans* secretam biomoléculas, porém por um curto período (~ 6 dias).
- A adição dos hormônios β ecdisona ou serotonina não aumentou a viabilidade celular nos cultivos de *T. brasiliensis* e *T. infestans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A., MARTIN, D., MANETTI, A.G.O., HAN, S.J., LEE, W.J. MATHIOPOULOS, K.D. Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoloxidase 1 gene in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 96, p. 14795–14800, 1999.

ALBUQUERQUE-CUNHA, J.M.; MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P.; SOUZA, W.; GONZALEZ, M.S.; NOGUEIRA, N.F.S. Effect of blood components, abdominal distension, and ecdysone therapy on the ultrastructural organization of posterior midgut epithelial cells and perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 8, p. 815-822, 2004.

ALENCAR, J.E. História Natural da Doença de Chagas no Estado do Ceará. Fortaleza: Imprensa Universitária. Universidade Federal do Ceará, 59 p., 1987.

ALVAREZ-HERNANDEZ, D.; NAVES, M.; SANTAMAREIA, I.; MENARGUEZ, J.; TORREGROSA, V.; CANNATA, J. Response of parathyroid glands to calcitriol in culture: Is this response mediated by the genetic polymorphisms in vitamin D receptor? *Kidney Int. Suppl.*, v. 85, p. 19-22, 2003.

AMINO, R.; MARFINS, R.M.; PROCÓPIO, J.; HIRATA, I.Y.; JULIANO, M.A.; SCHENKMAN, S. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 6207-6213, 2002.

ANDERSEN, J.F.; FRANCISCHETTI, I.M.; VALENZUELA, J.G.; SCHUCK, P.; RIBEIRO, J.M. Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic aminebinding protein from the saliva of a blood-feeding insect. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 4611–4617, 2003.

ANHÊ, A.C.B. e AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Cytochemical characterization of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* salivary gland cells (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae). *Micron*, v. 39, p. 1126-1133, 2008.

ANHÊ A.C.B.; LIMA-OLIVEIRA, A.P.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Acid phosphatase activity distribution in salivary glands of triatomines (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Genet. Mol. Res.*, v. 6, p. 197-205, 2007.

ARAÚJO, C.A.C.; WANIEK, P.J.; STOCK, P.; MAYER, C.; JANSEN, A.M.; SCHAUB, G.A. Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 36, p. 547-560, 2006a.

ARAÚJO, R.N.; SANTOS, A.; PINTO, F.S.; GONTIJO, N.F.; LEHANE, M.J.; PEREIRA, M.H. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 36, n. 9, p. 683-693, 2006b.

- ARAUJO, R.N.; CAMPOS, I.T.N.; TANAKA, A.S.; SANTOS, A.; GONTIJO, N.F.; LEHANE, M.J.; PEREIRA, M.H. Brasiliensin: a novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. *Int. J. Parasitol.*, v. 37, p. 1351-1358, 2007.
- ARDILA, A.; ESCOVAR, J.; BELLO, F. Características de nuevos cultivos celulares derivados de tejidos embrionarios de *Aedes aegypti* (Diptera; Culicidae). *Biomédica*, 25: 65-75, 2005.
- AZAMBUJA, P.; FEDER, D.; GARCIA, E.S. Effects of erythrocyte component diets on ecdysteroid production and ecdysis of *Rhodnius prolixus* nymphs. *J. Insect Physiol.*, v. 39, p. 13-16, 1993.
- AZAMBUJA, P., GARCIA, E.S. Characterization of inducible lysozyme activity in the hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 20, p. 539-548, 1987.
- BALDWIN, K.M.; HAKIM, R.S.; LOEB, M.J.; SADRUD-DIN, S.Y. Midgut development. In: BILLINGSLEY, P. F.; LEHANE, M. J. (eds.) *Biology of the insect midgut*, Chapman e Hall, London, p. 31-54, 1996.
- BAPTIST B.A. The morphology and physiology of the salivary glands of Hemiptera-Heteroptera. *Quart. J. Microsc. Sci.*, v.83, p.91-139, 1941.
- BARBOSA, L.; SILVA, L.M.; COELHO, P.M.Z.; SANTOS, S.R.; FORTES-DIAS, C.L. Primary culture of the region of the amebocyte-producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 6, p. 639-643, 2006.
- BARTH R. Estudos Anatômicos e Histológicos sobre a Subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). IV. Parte: O Complexo das Glândulas Salivares de *Triatoma infestans*. *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz*, v.52 (3/4), p.517-585, 1954.
- BARROS, V.C.; ASSUMPÇÃO, J.G.; CADETE, A.M.; SANTOS, V.C.; CAVALCANTE, R.R.; ARAUJO, R.N.; PEREIRA, M.H.; GONTIJO, N.F. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. *PLoS ONE*, v. 4, n. 6, e6047, p. 1-10, 2009.
- BARRETO, M.P. *Epidemiologia*. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. (Ed.). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 89-152, 1979.
- BEAUREGARD, C.; BRANDT, P.C.; CHIOU, G.C. Nitric oxide and cyclic GMP-mediated protein secretion from cultured lacrimal gland acinar cells. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, v. 18, p. 429-443, 2002.
- BILLINGSLEY, P.F. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): partial characterization and post-feeding activity of midgut aminopeptidases. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v. 15, p. 149-163, 1990.

- BILLINGSLEY, P.F.; LEHANE, M.J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: BILLINGSLEY, P. F.; LEHANE, M. J. (eds.), *Biology of the insect midgut*. Chapman e Hall, London, p. 3-30, 1996.
- BOMAN, H.G., FAYE, I., GUDMUNDSSON, G.H., LEE, J.-Y., LIDHOLM, D.-A. Cell-free immunity in *Cecropia*—a model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.*, v. 201, p. 23–31, 1991.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-54, 1976.
- CAMPOS, I.T.; AMINO, R.; SAMPAIO, C.A.; AUERSWALD, E.A.; FRIEDRICH, T.; LEMAIRE, H.G.; SCHENKMAN, S.; TANAKA, A.S. Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 32, n. 9, p. 991–997, 2002.
- CANÇADO, F.C.; EFFIO, P.C.; TERRA, W.R.; MARANA, S.R. Cloning, purification and comparative characterization of two digestive lysozymes from *Musca domestica* larvae. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 41, n. 11, p. 969-977, 2008.
- CARMEL, Z.; AMSALLEN, H.; METIOUI, M.; DEHAYE, J.P.; MORAN, A. Are salivary glands cell lines in culture a good model for purinergic receptors in salivary glands? *Arch. Oral Biol.*, v. 44, n. 1, p. 63-66, 1999.
- CARNEIRO, S.M.; ZABLITH, M.B.; KERCHOVE, C.M.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; QUISSELL, D.O.; MARKUS, R.P.; YAMANOUYE, N. Venom production in long-term primary culture of secretory cells of the *Bothrops jararaca* venom gland. *Toxicon*, v. 47, p. 87–94, 2006.
- CAVALCANTE, R.R.; PEREIRA, M.H.; GONTIJO, N.F. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitol.*, v. 127, n. 1, p. 87-93, 2003.
- CHAGAS, C. Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e verificação da tripanossomíase americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 15, p. 67-76, 1922.
- CHAMPAGNE, D.E.; NUSSENZVEIG, R.H.; RIBEIRO, J.M. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 8691-8695, 1995.
- CHAPMAN, R.F. *The insects: Structure and function*. 4ª edição, Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 38-68, 1998.
- DAFFRE, S., KYLSTEN, P., SAMAKOVLIS, C., HULTMARK, D. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol. Gen. Genet.*, v. 242, p. 152–162, 1994.

- DIAS, J. C. P. Doença de Chagas: ambiente, participação e Estado. *Cad. Saúde Pública*, v. 17, p. 165-169, 2001.
- DIMARCQ, J.L., IMLER, J.L., LANOT, R., EZEKOWITZ, R.A.B., HOFFMANN, J.A., JANEWAY, C.A. Treatment of *l(2)mbn Drosophila* tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 27, p. 877-886, 1997.
- DIOTAIUTI, L.; FARIA FILHO, O.F.; CARNEIRO, F.C.; DIAS, J.C.; PIRES, H.H.; SCHOFIELD, C.J. Operational aspects of *Triatoma brasiliensis* control. *Cad. Saúde Pública*, v. 16, p. 61-67, 2000.
- DUARTE, M.M.; MONTES DE OCA, H.; DINIZ, C.R.; FORTES-DIAS, C.L. Primary culture gland cells from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon*, v. 37, p. 1673-1682, 1999.
- DURBAN, E.M. Mouse submandibular salivary epithelial cell growth and differentiation in long-term culture: influence of the extracellular matrix. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, v. 26, p. 33-43, 1990.
- EDWARDS, J.F., HIGGS, S., BEATY, B.J. Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice. *J. Med. Entomol.*, v. 35, p. 261-265, 1998.
- FALLON, A.M.; HAGEDORN, H.H.; WYATT, G.R.; LAUFER, H. Activation of vitellogenin synthesis in the mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone. *J. Insect Physiol.*, v. 20, n. 9, p. 1815-1823, 2003.
- FAUDRY, E.; LOZZI, S.P.; SANTANA, J.M.; D'SOUZA-AULT, M.; KIEFFER, S.; FELIX, C.R.; RICART, C.A.; SOUSA, M.V.; VERNET, T.; TEIXEIRA, A.R. *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 19607-19613, 2004.
- FEDER, D.; MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Immune responses in *Rhodnius prolixus*: influence of nutrition and ecdysone. *J. Insect Physiol.*, v. 43, n. 6, p. 513-519, 1997.
- FINKBEINER, W.E.; ZLOCK, L.T.; MEHDI, I.; WIDDICOMBE, J.H. Cultures of human tracheal gland cells of mucous or serous phenotype. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 2009. *In press*.
- FRANCISCHETTI, I.M.; RIBEIRO, J.M.; CHAMPAGNE, D.; ANDERSEN, J. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 2639-2650, 2000.
- FRANSSSENS, V., SMAGGHE, G., SIMONET, G., CLAEYS, I., BREUGELMANS, B., DE LOOF, A. 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone regulate the laminarin-induced nodulation reaction in larvae of the flesh fly, *Neobellieria bullata*. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 30, p. 735-740, 2006.

FRIEDRICH, T.; KROGER, B.; BIALOJAN, S.; LEMAIRE, H.G.; HOFFKEN, H.W.; REUSCHENBACH, P.; OTTE, M.; DODT, J. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.*, v. 268, n. 22, p. 16216–16222, 1993.

FUENTES-PRIOR, P., NOESKE-JUNGBLUT, C., DONNER, P., SCHLEUNING, W.D., HUBER, R., & BODE, W. Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 94, n. 22, p. 11845-11850, 1997.

GARCIA, E.S.; MELLO, C.B.; AZAMBUJA, P.; RIBEIRO, J.M.C. *Rhodnius prolixus*: salivary anti-hemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Exp. Parasitol.*, v. 78, p. 287-293, 1994.

GERMAN, T.; BARASH, I. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland. *In vitro Cell Dev. Biol.*, v. 38, p. 282-292, 2002.

GOLODNE, D.M.; MONTEIRO, R.Q.; GRACA-SOUZA, A.V.; SILVA-NETO, M.A.; ATELLA, G.C. Lysophosphatidylcholine acts as an anti-hemostatic molecule in the saliva of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 27766-27771, 2003.

GONZALEZ, M.S.; NOGUEIRA, N.F.S.; FEDER, D.; SOUZA, W.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S. Role of the head in the ultrastructural midgut organization in *Rhodnius prolixus* larvae: evidence from head transplantation experiments and ecdysone therapy. *J. Insect Physiol.*, v. 44, p. 553-560, 1998.

GREGORIO, E.A.; RATCLIFFE, N.A. The distribution of agglutinins and lytic activity against *Trypanosoma rangeli* and erythrocytes in *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* tissue extracts and haemolymph. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 86, n. 2, p.181-186, 1991.

GUARNERI, A.A.; PEREIRA, M.H.; DIOTAIUTI, L. Comparison of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. *J. Insect Physiol.*, v. 46, n. 7, p. 1121-1127, 2000.

GRUBHOFFER, L.; HYPISA, V.; VOLF, P. Lectins (hemagglutinins) in the gut of the important disease vectors. *Parasite.*,v. 4, n. 3, p. 203-216, 1997.

HAKIM, R.S.; CACCIA, S.; LOEB, M.; SMAGGHE, G. Primary culture of insect midgut cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.*, v. 45, p. 106-110, 2009.

HARSHINI, S.; NACHMAN, R.J.; SREEKUMAR, S. In vitro release of digestive enzymes by FMRF amide related neuropeptides and analogues in the lepidopteran insect *Opisina arenosella* (Walk.). *Peptides*, v. 23, n. 10, p. 1759-1763, 2002.

HECKER, H. Structure and function of midgut epithelial cells in culicidae mosquitoes (Insecta, Diptera). *Cell and Tissue Res.*, v. 184, p. 321–341, 1977.

HECKER, H.; SCHWARZENBACH, M.; RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug, *Rhodnius prolixus*. *Parasitol. Res.*, v. 76, n. 4, p. 311-318, 1990.

- HELLMANN, K.; HAWKINS, R.I. Prolixin-S and Prolixin-G: two anticoagulants from *Rhodnius prolixus* Stal. *Nature*, v. 207, p. 265-267, 1965.
- HINK, W.F.; BUTZ, J.J. Primary culture of ant venom gland cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, v. 21, n. 6, p. 333-339, 1985.
- HOUK, E.J. Midgut ultrastructure of *Culex tarsalis* (Diptera: Culcidae) before and after a bloodmeal. *Tissue and Cell*, v. 9, p. 103-118, 1977.
- HULTMARK, D. Insect lysozyme. In: Jolle's, P. (Ed.), *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, p. 87-102, 1996.
- HYPSA, V.; GRUBHOFFER, L. An LPS-binding hemagglutinin in the midgut of *Triatoma infestans*: partial characterization and tissue localization. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v. 28, p. 247-255, 1995.
- ISAWA, H.; YUDA, M.; YONEDA, K.; CHINZEI, Y. The insect salivary protein, prolixin-S, inhibits factor IXa generation and Xase complex formation in the blood coagulation pathway. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 6636-41, 2000.
- JONES, L.D.; HODGSON, E.; NUTTALL, P.A. Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *J. Gen. Virol.*, n. 70, p. 1895-1898, 1989.
- KAUFMANN, L.; SCHURMANN, F.; YIALLOUROS, M.; HARREWIJN, P.; KAYSER, H. The serotonergic system is involved in feeding inhibition by pymetrozine. Comparative studies on the locust (*Locusta migratoria*) and on an aphid (*Myzus persicae*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, v. 138, n. 4, p. 469-483, 2004.
- KOLLIEN, A.H.; FECHNER, S.; WANIEK, P.J.; SCHAUB, G.A. Isolation and characterization of a cDNA encoding for a lysozyme from the gut of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v. 53, p. 134-145, 2003
- KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol. Today*, v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000.
- LABUDA, M.; JONES, L.D.; WILLIAMS, T.; NUTTALL, P.A. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Med. Vet. Entomol.*, v. 7, p. 193-196, 1993.
- LACOMBE, D. Anatomia e histologia das glândulas salivares nos triatomíneos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 557-564, 1999.
- LACOMBE, D. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). VII. Parte: Estudo anatômico do ducto intestinal do *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 51, n. 1, p. 69-111, 1957.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

- LALOUETTE, L.; RENAULT, D.; RAVAUX, J.; SIAUSSAT, D. Effects of cold-exposure and subsequent recovery on cellular proliferation with influence of 20-hydroxyecdysone in a lepidopteran cell line (IAL-PID2). *Comp. Biochem. Physiol., Part A*, v. 155, p. 407-414, 2010.
- LANGE, A.B.; ORCHARD, I.; BARRETT, M.F. Changes in haemolymph serotonin levels associated with feeding in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, v. 35, n. 5, p. 393-399, 1989.
- LANOT, R., ZACHARY, D., HOLDER, F. AND MEISTER, M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, v. 230, p. 243-257, 2001.
- LARA, F.A.; LINS, U.; BECHARA, G.H.; OLIVEIRA, P.L. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Exp. Biol.*, v. 208, p. 3093-3101, 2005.
- LAVOPIERRE, M.M.J.; DICKERSON, G.; GORDON, R.M. Studies on the methods of feeding of blood sucking arthropods: I-The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effect of the bite on human volunteers. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, v. 53, p. 235-252, 1959.
- LENT, C.M.; DICKINSON, N.H. The neurobiology of feeding in leeches. *Sci. Am.*, v. 256, p. 98-103, 1988.
- LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae) and their significance as vector of Chagas' disease. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, v. 163, p. 125-520, 1979.
- LIMESAND, K.H., HIGGS, S., PEARSON, L.D., BEATY, B.J. Potentiation of vesicular stomatitis New Jersey virus infection in mice by mosquito saliva. *Parasite Immunol.*, v. 22, p. 461-467, 2000.
- LONG, T.F.; MURDOCK, L.L. Stimulation of blowfly feeding behaviour by octopaminergic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 80, n. 13, p. 4159-4163, 1983.
- LOPEZ, L., MORALES, G., URSIC, R., WOLFF, M., LOWENBERGER, C. Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 33, p. 439-447, 2003.
- MARSHALL, N. Allergy to *Triatoma protracta* (Heteroptera: Reduviidae). II. Antigen production in vitro. *J. Med. Entomol.*, v. 19, p. 253-254, 1982.
- MEIRELLES, R.M.S.; RODRIGUES, I.S.; STEINDEL, M.; SOARES, M.J. Ultrastructure of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 35, n. 2, p. 199-207, 2003.
- MONTFORT, W.R.; WEICHSEL, A. ANDERSEN, J.F. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochim. Biophys. Acta*, V. 1482, P. 110-118, 2000.

MULLER, H.M., DIMOPOULOS, G., BLASS, C. AND KAFATOS, F.C. A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 11727–11735, 1999.

NÄSSEL, D.R. Serotonin and serotonin-immunoreactive neurons in the nervous system of insects. *Prog. Neurobiol.*, v. 30, n. 1, p. 1–85, 1988.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; HAENDLER, B.; DONNER, P.; ALAGON, A.; POSSANI, L.; SCHLEUNING, W.D. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 28629-28634, 1995.

NUSSENZVEIG, R.H.; BENTLEY, D.L.; RIBEIRO, J.M.C. Nitric oxide loading of salivary nitric-oxide loading of the salivary nitric-oxide-carrying hemoproteins (nitrophorins) in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.*, v. 198, p. 1093-1098, 1995.

OKUDA, K.; ALMEIDA, F.; MORTARA, R. A.; KRIEGER, H.; MARINOTTI, O.; BIJOVSKY, A. T. Cell death and regeneration in the midgut of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.*, v. 53, p. 1307-1315, 2007.

OKUDA, K.; SOUZA-CAROCCI, A.; RIBOLLA, P.E.; BIANCHI, A.G.; BIJOVSKY, A.T. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue and Cell*, v. 34, p. 210–219, 2002.

ORCHARD, I. Serotonin: A coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A, Mol. Integr. Physiol.*, v. 144, n. 3, p. 316-324, 2006.

ORCHARD, I.; LANGE, A.B.; BARRETT, F.M. Serotonergic supply to the epidermis of *Rhodnius prolixus*: evidence for serotonin as the plasticising factor. *J. Insect Physiol.*, v. 34, n. 9, p. 873–879, 1988.

PEREIRA, M.E.A.; ANDRADE, A.F.B.; RIBEIRO, J.M.C. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science*, v. 211, n. 4482, p. 227-234, 1981.

PUCKETT, L.G., LEWIS, J.K., URBAS, A., CUI, X., GAO, D., BACHAS, L.G. Magnetoelastic transducers for monitoring coagulation, clot inhibition, and fibrinolysis. *Biosens. Bioelectron.*, v. 20, p. 1737-43, 2005.

RAMÍREZ-PÉREZ, J. Estudio sobre la anatomía de *Rhodnius prolixus*. *Rev. Venez. Sanid.*, v. 34 p. 11-98, 1969.

REIN, J; ZIMMERMANN, B.; HILLE, B.; LANG, C.; WALZ, B.; BAUMANN, O. Fluorescence measurements of serotonin-induced V-ATPase-dependent pH changes at the luminal surface in salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *J. Exp. Biol.*, v. 209, p. 1716-1724, 2006.

REIS, M.M.; MEIRELLES, R.M.S.; SOARES, M.J. Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Tissue and Cells*, v. 35, p. 393-400, 2003.

REYNOLDS, S.E. Pharmacological induction of plasticization in the abdominal cuticle of *Rhodnius*. *J. Exp. Biol.*, v. 61, n. 3, p. 705–718, 1974.

REYNOLDS, S.E. Hormonal control of cuticle mechanical properties. In: Kerkut, G. A.; Gilbert, L. I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, p. 335–351, 1985.

RIBEIRO, J. M. C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.*, v. 4, n. 3, p. 143–152, 1995.

RIBEIRO, J.M.C. Blood feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives three genera (*Aedes*, *Anophles*, *Culex*). *Med. Vet. Entomol.*, v. 14, n. 2, p. 142-148, 2000.

RIBEIRO, J. M.C. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Exp. Parasitol.*, v. 64, n. 3, p. 347-353, 1987.

RIBEIRO, J.M.C.; ANDERSEN, J.; SILVA-NETO, M.A.C.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.K.; VALENZUELA, J.G. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 34, p. 61–79, 2004.

RIBEIRO, J.M.C.; FRANCISCHETTI, I.M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 48, p. 73-88, 2003.

RIBEIRO, J.M.C.; GARCIA, E.S. Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Experientia*, v. 37, p. 384-386, 1981.

RIBEIRO, J.M.C.; HAZARD, J.M.; NUSSENVEIG, R.H.; CHAMPAGNE, D.E.; WALKER, F.A. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science*, v. 23, p. 539-541, 1993.

RIBEIRO, J.M.C.; SCHNEIDER, M.; GUIMARÃES, J.A. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking *Rhodnius prolixus*. *J. Biochem.*, v. 308, p. 243-249, 1995.

RIBEIRO, J.M.C.; SCHNEIDER, M.; ISAIAS, T.; JURBERG, J.; GALVÃO, C.C.; GUIMARÃES, J.A. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *J. Med. Entomol.*, v. 35, p.599–610, 1998.

ROSENBERG, I.M. Protein analysis and purification: benchtop techniques, Chapter 4: Electrophoretic techniques, C: detection of protein bands in polyacrylamide gels. Boston: Birkhäuser, 2 ed., p. 100-101, 2005.

RUSSELL, V.W.; DUNN, P.E. Lysozyme in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v. 17, p. 67–80, 1991.

SANT'ANNA, M.R.V.; DIOTAIUTI, L.; GONTIJO, A.F.; GONTIJO, N.F.; PEREIRA, M.H. Feeding behaviour of morfologically similar *Rhodnius* species: influence of medical characteristics and salivary function. *J. Insect Physiol.*, v. 47, p. 1459- 1465, 2001.

- SARKIS, J.J.F.; GUIMARÃES, J.A.; RIBEIRO, J.M.C. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification. *Biochem. J.*, v. 233, p. 885–891, 1986.
- SCHEWE, B.; SCHMÄLZLIN, E.; WALZ, B. Intracellular pH homeostasis and serotonin-induced pH changes in *Calliphora* salivary glands: the contribution of V-ATPase and carbonic anhydrase. *J. Exp. Biol.*, v. 211, p. 805-815, 2008.
- SCHOFIELD, C.J. Triatominae, biología y control. United Kingdom: Eurocommunica Publications., 79 p., 1994.
- SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.*, v. 22, n. 12, p. 583-588, 2006.
- SCHUSTER, J.P., SCHAUB, G.A. *Trypanosoma cruzi*: skin-penetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 1475-1479, 2000.
- SILVA, L.S.; LAGES, C.P.; VENUTO, T.; LIMA, R.M.; DINIZ, M.V.; VALENTIM, C.L.; BABA, E.H.; PIMENTA, P.F.; FORTES-DIAS, C.L. Primary culture of venom glands from the Brazilian armed spider *Phoneutria nigriventer* (Araneae, Ctenidae). *Toxicon*, v. 51, n. 3, p. 428-434, 2008.
- SIMANSKY, K.J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav. Brain Res.*, v. 73, p. 37–42, 1996.
- SHERLOCK, I.A. Vetores. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. (Ed.). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 42-89, 1979.
- SMITH, J.J.B. Feeding mechanisms. In: Kerkut, J.A.; GILBERT, L.E. *Comp. Insect Physiol. Biochem.*, v. 4, p. 33-85, 1985.
- SONG, J.S.; KIM, C.H.; HEO, J.Y.; CHO, Y.S. Rosiglitazone reduces a wide range of proinflammatory profiles in synovial fibroblast SW982 under spheroid culture. *Immunol. Lett.*, 2010. *In press*.
- SORRENTINO, R.P.; CARTON, Y.; GOVIND, S. Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev. Biol.*, v. 243, p. 65–80, 2002.
- SUNITHA, V.B.; REENA, T.; HARSHINI, S.; SREEKUMAR, S. Is gut pH regulated by midgut endocrine system in larvae of *Rhynchophorus ferrugineus* Fab.? *Indian J. Exp. Biol.*, v. 37, p. 476-480, 1999.
- TITUS, R.G., RIBEIRO, J.M.C. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*, v. 239, p. 1306–1308, 1988.
- TZOU, P., OHRESSER, S., FERRANDON, D., CAPOVILLA, M., REICHHART, J.M., LEMAITRE, B. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity*, v. 13, p. 737–748, 2000.

URSIC BEDOYA, R.J., MITZEY, A.M., OBRAZTSOVA, M., LOWENBERGER, C. Molecular cloning and transcriptional activation of lysozymeencoding cDNAs in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, v. 14, p. 89–94, 2005.

VALENZUELA, J.G., PHAM, V.M., GARFIELD, M.K., FRANCISCHETTI, I.M., RIBEIRO, J.M. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 32, p. 1101–1122, 2002.

YAMAMURO, Y; AOKI, T.; SENSUI, N. Effect of estradiol and FBS on PRL cells, GH cells, and PRL/GH cells on primary cultures of pituitary cells from prenatal rats. *Exp. Biol. Med.*, v. 226, p. 140-143, 2001.

WATKINS, R. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 17, n. 1, p. 59-66, 1971.

ZANG, Z. e PALLI, S. R. Identification of a cis-regulatory element required for 20-hydroxyecdysone enhancement of antimicrobial peptide gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.*, v. 18, n. 5, p. 595-605, 2009.

ANEXO

Artigo científico: “Primary culture of *Rhodnius prolixus*
(Hemiptera: Reduviidae) salivary gland cells”